

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

Mémoire publié à l'occasion du jubilé de É. Metchnikoff.

METCHNIKOVELLIDÆ

ET AUTRES PROTISTES PARASITES DES GRÉGARINES D'ANNÉLIDES

par M. CAULLERY et F. MESNIL.

(Avec la planche V.)

§ I. — HISTORIQUE

Sous le titre « Sur un type nouveau (*Metchnikovella* n. g.) d'organismes parasites des Grégarines », nous avons fait connaître, il y a vingt et un ans, par de courtes notes présentées à la Société de Biologie et à l'Académie des Sciences (1), — cette dernière accompagnée de figures, — certains des curieux Protistes dont il va être question ici. Depuis lors, nous avons fait allusion à la découverte de nouvelles espèces (2); mais d'autres travaux nous avaient détournés de donner le mémoire d'ensemble que nous avions toujours projeté. La publication d'un livre en l'honneur d'ÉLIE METCHNIKOFF nous a paru une occasion

(1) CAULLERY et MESNIL, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. XLIX, p. 960, et *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. 125, 1917, p. 787.

(2) CAULLERY et MESNIL, *C. R. Ass. franç. Avanc. Sc.*, Congrès de Boulogne, 1899, et « Recherches sur les Haplosporidies », *Arch. zool. expér.* (sér. 4), t. IV, 1905, p. 168.

opportune de faire voir le jour à ce mémoire sur des organismes dédiés précisément à Metchnikoff. En novembre 1914, nous avons donné un résumé visant surtout la partie systématique de notre travail (1).

Nous avons dit, dans nos premières communications, que des *Metchnikovella* avaient été vues avant nous. Elles l'ont été par Claparède d'abord (2), qui les avait interprétées comme spores (« pseudo-navicules ») de la grégarine qui les renfermait. Or, il suffit de comparer les figures de Claparède, que nous reproduisons page 232, avec celles qui accompagnent ce travail, pour n'avoir aucun doute sur leur attribution à des *Metchnikovella*.

Léger, ensuite (3), a décrit et bien figuré des inclusions cytoplasmiques chez deux grégaires d'une *Audouinia* : « Ce sont, dit-il, de petits corpuscules cylindriques ou naviculaires, pourvus d'une paroi et dont la configuration est si régulière et si uniforme, qu'ils ressemblent beaucoup à des spores. » Il note leur inconstance : « C'est, dit-il, une particularité plutôt due à un état spécial de l'hôte qu'à la grégarine elle-même. » Léger n'a bien vu que les kystes; il note pourtant que les « formations apparaissent sous forme de petites portions distinctes d'entocyte plus clair », et, fort justement, il constate que le noyau de la grégarine reste présent. N'ayant pas réussi à mettre de noyau en évidence dans les kystes, où il n'a vu que des granulations, et n'ayant pas aperçu les stades antérieurs, Léger s'est trouvé éloigné de songer à des parasites et il pose surtout, sans le résoudre, le problème de savoir s'il s'agit d'éléments de réserve, ou de bourgeons internes reproducteurs.

Labbé (4), en classant les *Metchnikovella* dans les *Incertæ sedis* des *Sporozoa* du *Tierreich*, cite les espèces que nous venions de décrire et leur en adjoint une autre, en interprétant un texte de Leidy qui nous avait échappé.

Chez une grégarine d'un *Oligochète*, *Distichopus sylvestris*,

(1) CAULLERY et MESNIL, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. LXXVII, nov. 1914, p. 527.

(2) CLAPARÈDE, *Mém. Soc. Phys. et Hist. nat. de Genève*, t. XVI, 1861 (v. p. 159 et pl. IV, fig. 8 et 9).

(3) LÉGER, *Recherches sur les Grégaires*, *Tablettes zool.*, t. III, 1892, et *Thèse doct. Sc. Nat. Paris*, 1894.

(4) LABBÉ, *Sporozoa, Tierreich*, livr. 5, 1899 (v. p. 125).

qu'il appelle *Monocystis mitis* (? *Gregarina enchytræi* Kölliker), Leidy (1) a vu des corps qu'il pense être des spores. « These are curved elliptical bodies 0^{mm}015 long by 0,0045 wide, and were collected into a group of usually two or three to seven, sometimes in advance of the nucleus and sometimes behind it. » On ne peut, d'après cette description et la figure trop schématique de Leidy, savoir s'il s'agit d'une *Metchnikovella* ou d'un autre micro-organisme; mais, comme nous allons le voir, Hesse a tranché la question en faveur des *Metchnikovella*.

Depuis 1897, il n'a pas été beaucoup ajouté à nos connaissances sur les organismes nouveaux, dont nous faisons connaître la nature parasitaire et en partie l'évolution. Des auteurs ont signalé d'autres inclusions parasitaires chez diverses grégaires.

Montgomery, en 1898 (2), a vu, chez une grégarine de l'intestin d'un Némertien, *Lineus gesserensis*, à noyau intact, de petits éléments nucléés remplir l'endoplasme, mais il n'a pas noté trace de kystes comme chez les *Metchnikovella*.

Dogiel, en 1906 (3), a décrit, sous le nom de *Hyalosphæra gregarinicola*, un parasite de la grégarine *Cystobia chiridotæ* et en a fait une coccidie. Il est certain que les divers stades observés ne rappellent pas une *Metchnikovella*; mais la détermination coccidie nous paraît à tout le moins douteuse.

Le même auteur, en 1907 (4), décrit comme schizogonie d'une grégarine, appelée par lui *Schizocystis sipunculi*, mais qui ressemble à un *Selenidium*, des états qui paraissent bien plutôt représenter un parasite de l'endoplasme de la grégarine. Telle fut, d'ailleurs, l'opinion de Brasil et Fantham (5), qui avaient eu l'occasion d'observer des inclusions parasitaires chez des *Selenidium* de Phascolosomes et aussi d'Annélides Polychètes; il existe, disent-ils, non seulement le stade en morula, — que nous-mêmes avons signalé incidemment (6) —, mais beaucoup d'autres états, entre autres les kystes vus par Léger chez un *Platy-*

(1) LEIDY, *Proc. Acad. of nat. Sc.*, Philadelphie, t. XXXIV, mai 1882, p. 145.

(2) MONTGOMERY, *Journ. of Morphol.*, t. XV, f. 2, nov. 1898 (v. p. 403).

(3) DOGIEL, *Arch. f. Protistenk.*, t. VII, 1906, p. 106.

(4) Id., *Ibid.*, t. VIII, 1907, p. 203.

(5) BRASIL et FANTHAM, *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. CXLIV, 4 mars 1907, p. 518.

(6) CAULLERY et MESNIL, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. LI, 14 oct. 1899, p. 791, et *Arch. zool. expér.*, t. IV, 1905 (v. p. 168).

cystis (= *Selenidium*) d'*Audouinia*. Ces auteurs n'ont malheureusement pas précisé leurs observations. Peut-être faut-il rapprocher des constatations de Dogiel celles de Swarczewsky (1) qui, chez une *Lankesteria* de planaire du lac Baïkal, a trouvé des formations analogues qu'il interprète comme schizogonie de la grégarine.

En 1908, Averinzew, dans un travail écrit en russe, que nous n'avons pu consulter que tout récemment (2), a décrit en détails une *Metchnikovella selenidii*; il nous paraît bien s'agir d'une véritable *Metchnikovella* (v. p. 229).

La même année, Annie Porter (3) a observé un parasite d'une Schizogrégarine d'Ascidie, *Mesogregarina amaroucii*; elle le rapproche de *Chytridiopsis socius* et surtout du parasite des *Selenidium* de Brasil et Fantham.

Dans sa monographie des Monocystidées des Oligochètes, Hesse (4) signale plusieurs parasites de grégarines. D'abord, le parasite découvert par Leidy; Hesse montre qu'il s'agit bien d'une *Metchnikovella*; nous en parlerons plus loin.

Chez d'autres grégarines, parasites des testicules, l'auteur a rencontré des microbes, différents suivant l'espèce grégarienne considérée, et qui paraissent être de nature bactérienne; chez *Monocystis lumbrici*, ces microbes ne se rencontrent que chez des individus en dégénérescence; chez les autres, ils attaquent des individus d'apparence tout à fait normale. Léger, de son côté (5), a observé, dans le cytoplasme d'une autre grégarine, *Schizocystis gregarinoïdes*, des éléments parasitaires qu'il rapproche aussi des bactéries.

Egalement en 1909, Léger et Duboscq ont fait connaître deux cas de parasitisme des grégarines par des microsporidies: *Frenzelina conformis* d'un crabe, parasitée par *Nosema frenzelinae*, microsporidie monosporée (6); *Lankesteria ascidia*, para-

(1) SWARCZEWSKY, *Festschrift f. R. Hertwig*, t. I, 1910, p. 637.

(2) AVERINZEW, Etudes sur les protozoaires parasites I-VII (en russe avec résumé allemand). *Trav. Soc. Imp. Nat. Saint-Petersbourg*, t. XXXVIII, f. 2, 1908, *Sect. Zool. et Physiol.* (v. p. 109); analysé dans *Zool. Centralbl.*, t. XV, sept. 1908.

(3) MISS PORTER, *Arch. zool. expér.* (4), t. IX, 1908, N. et R., p. XLIV, et *Arch. f. Protistenk.*, t. XV, 1909, p. 227.

(4) HESSE, *Arch. zool. expér.* (5), t. III (v. p. 233 et suiv.), et *Thèse doct. Sc. Nat.*, Paris 1909.

(5) LÉGER, *Arch. f. Protistenk.*, t. XVIII, 1909, p. 85 (v. p. 104).

(6) LÉGER et DUBOSCOQ, *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. 148, 15 mars 1909, p. 733 (fig. dans *Arch. f. Protistenk.*, t. XVII, 1909, pp. 117-119).

sitée par *Perezia lankesteriæ*, microsporidie disposée (1). Les auteurs interprètent le cas de miss Porter comme étant aussi une microsporidie grégarinophile; ils font remarquer que *Chytridiopsis socius* n'envahit que très exceptionnellement le *Stylorhynchus longicollis*. Il est possible aussi que la schizogonie, signalée par Averinzew (2) chez une grégarine d'un Némertien du genre *Amphiporus*, soit également l'évolution d'une microsporidie, comme certaines des figures incitent à le croire.

Nous allons d'abord faire connaître nos observations sur les *Metchnikovella*, ou plutôt les *Metchnikovellidæ*, car toutes les espèces connues ne peuvent être classées dans un genre unique; puis nous parlerons des autres parasites des grégarines.

§ II. — CARACTÈRES GÉNÉRAUX DES METCHNIKOVELLIDÆ.

ÉVOLUTION. AFFINITÉS.

HABITAT. — Les *Metchnikovellidæ* sont des parasites du cytoplasme de grégarines intestinales d'annélides; toutes, à l'exception d'une seule, se rencontrent dans des grégarines d'Annélides polychètes marines; *Metchn. hessei*, en revanche, parasite le cytoplasme d'une grégarine d'Oligochètes terrestres.

Toutes nos observations personnelles ont porté sur des Polychètes de la région du Cap de la Hague (Manche); mais il ne nous paraît pas douteux que les *Metchnikovellidæ* sont cosmopolites, puisque Léger en a observé chez des Polychètes à Belle-Isle-en-Mer, Claparède aux îles Hébrides, Averinzew dans la baie de Kola, Leidy dans des Oligochètes terrestres des États-Unis (Pennsylvanie), Hesse dans des Oligochètes de la Haute-Saône.

Les grégarines parasitées appartiennent à divers groupes: Monocystidées (*Lecudina* et *Ophioidina* d'Annélides errantes, *Selenidium* d'Ann. sédentaires, genre auquel il faut peut-être rattacher le *Monocystis mitis* Leidy d'Oligochètes); Dicystidées (*Polyrhabdina* et *Ancora* d'Ann. sédentaires), et Tricys-

(1) LÉGER et DUBOSQ, *Arch. zool. expér.* (5), t. I, N. et R., p. LXXXIX, 1909.

(2) AVERINZEW, *Zool. Anz.* t. XXXIII, 1908, p. 685, et *Arch. f. Protistenk.*, t. XVI, 1909, p. 71 (v. en particulier les fig. 27-29).

tidées [*Sycia* = *Ulivina* (1)]. Il ne semble pas y avoir parallélisme entre la structure des *Metchnikovellidæ* et celle des grégarines-hôtes. On peut rencontrer, chez la même espèce de grégarine, deux espèces de parasites, de forme assez dissemblable. Notons pourtant que les *Metchnikovellidæ*, à kystes en forme de bâtonnet allongé, paraissent propres aux *Ancora*.

Quand l'infection existe, elle affecte presque toujours la plupart des grégarines d'une même Annélide.

KYSTES. CLASSIFICATION. — Ce qui caractérise avant tout les *Metchnikovellidæ*, ce sont leurs kystes : formations plus ou moins allongées, allant d'un type ovoïde (la longueur ne dépasse guère le double de la largeur) jusqu'à des bâtonnets, où la longueur atteint 25 fois la largeur, et des fuseaux, également très allongés, à extrémités très effilées ; la largeur va de 2 μ à 6 μ 5. Ces kystes ont une paroi épaisse qui se laisse difficilement traverser par les matières colorantes et qui est souvent renforcée aux extrémités par une sorte de bouchon (v. fig. A, 2, 4 et 6) ; cette disposition est même exagérée chez l'espèce type, *Metchn. spionis*, où il y a de longues parties terminales, qui paraissent même creusées d'une sorte de canal (fig. A, 1 d).

A l'intérieur de ces kystes, on distingue un certain nombre de corpuscules immobiles, bien individualisés, de forme légèrement ovoïde, ou en pépin de raisin (fig. A, 1 e). On arrive, sur coupes, à colorer dans chaque corpuscule un grain ou une petite masse chromatique centrale (pl. V, fig. 5). Il s'agit très vraisemblablement de germes, spores nues protégées par l'enveloppe du kyste.

Le nombre de ces spores paraît relativement constant pour une espèce déterminée, mais variable pour les diverses espèces : 8, 12, 16, 32 ; on en compte parfois une centaine chez l'espèce aberrante, *Amphiacantha longa*.

Étant donnée la variété de formes de ces kystes, nous avons cru devoir, dans notre note de 1914, élever les *Metchnikovella* au rang de *famille*, et grouper les diverses espèces en trois genres :

1. Nous avons conservé le genre *Metchnikovella* pour toutes

(1) Au sujet de ces genres de grégarines, voir CAULLERY et MESNIL, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. LXXVII, 14 nov. 1914, p. 516.

les espèces (fig. A, 1-7) chez lesquelles la longueur des kystes n'excède pas dix fois leur largeur. Ils sont tous cylindriques ou fusiformes, à extrémités arrondies. Leur forme générale reste assez variable. L'espèce type, *M. spionis*, occupe une place à part, en raison de la constitution spéciale des extrémités du kyste, extrémités allongées et ne renfermant pas de spores (fig. 1 d); chez d'autres espèces, comme *M. legeri* (fig. 6), il y a

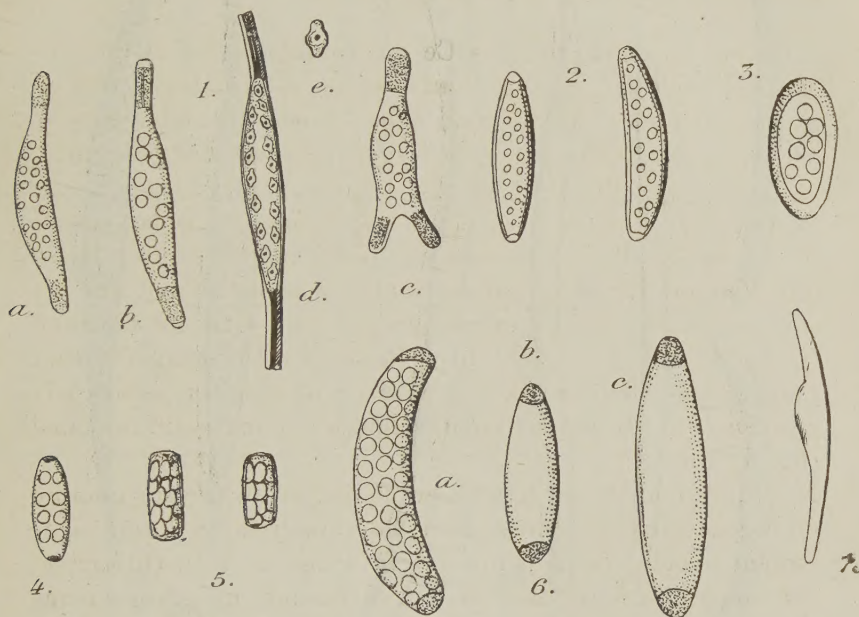


FIG. A. — 1. *Metchnikovella spionis* : a, b, c, d'après le vivant (c, kyste anormal); d, d'après les préparations colorées; e, spore. — 2. *Metch. incurvata* : à gauche, kyste vu de face; à droite, vu de profil. — 3. *Metch. oviformis*. — 4. *Metch. nereidis*. — 5. *Metch. minima* (d'après Léger). — 6. *Metch. legeri*; a, kyste vu de profil; b et c, kystes vus de face. — 7. *Metch. claparedei* (d'après Claparède). — G. = 1.250 D.

un épaississement polaire assez marqué. De même, il n'y a pas de différence tranchée entre les formes en fuseau et les cylindriques. *M. claparedei* (1) fait le passage au genre suivant.

2. Nous avons créé le genre *Amphiamblys* (2) pour des espèces à kystes cylindriques, longs, plus ou moins arqués,

(1) Nous ne l'avons pas observée nous-mêmes; l'importance du renflement, situé vers le milieu du kyste et figuré par Claparède, serait à préciser.

(2) De ἀμψι et ἀμβλύς, émoussé.

arrondis aux extrémités, et dont la longueur dépasse dix fois la largeur. Nous n'en connaissons que deux espèces qui parasitent, d'ailleurs, des grégaires de même type (fig. B, 8 et 9).

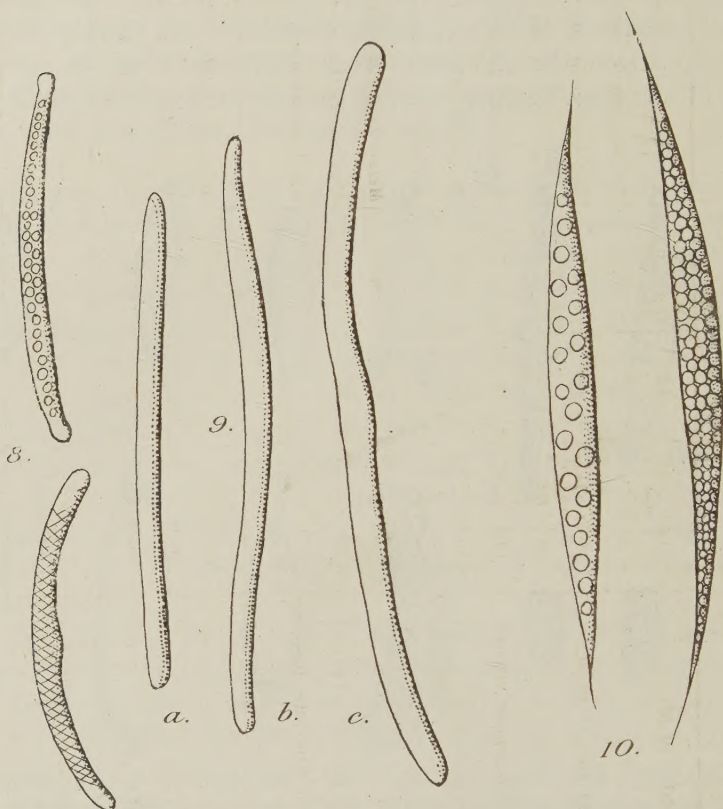


FIG. B. — 8. *Amphiamblys capitellidis*. — 9. *Amphiamblys capitellæ*: a et b, kystes d'une grégarine en comète; c (var. *longior*), kyste d'une *Anchora sagittata* type. — 10. *Amphiacantha longa*: à gauche, kyste vu de face; à droite, vu de profil. — G. = 1.250 D.

3. Enfin, il nous a paru utile de créer un troisième genre *Amphiacantha* (1) pour l'espèce à kystes terminés en deux longues pointes effilées, que nous avons observée dans la grégarine d'un Eunicien.

Le tableau ci-dessous (2) résume ce qui concerne l'habitat et les caractères des diverses espèces :

(1) De ἀμφι et ἄκανθα, épine.

(2) Ce tableau reproduit, complété, celui que nous avons publié en 1914.

ANNÉLIDE	GRÉGARINE	DIMENSIONS des KYSTES EN μ	NOMBRE de SPORES	INDICATION ⁽¹⁾ de la FIGURE (2)	NOM DU PARASITE
<i>Spio martinensis</i> . . .	<i>Polyrhhabdina brasili</i> C. et M.	20-40 \times 4	16	A 1	<i>Metchnikovella spionis</i> C. et M., 1897.
<i>Id.</i>	<i>Id.</i>	40 \times 5	12	E 2	<i>Metchnikovella brasili</i> n. sp.
<i>Pygospio seticornis</i> . .	<i>Polyrhhabdina pygospionis</i> C. et M. . . .	18-22 \times 4	16	A 2	<i>Metchnikovella incurvata</i> C. et M., 1914.
<i>Id.</i>	<i>Id.</i>	14 \times 6,5	8	A 3	<i>Metchnikovella oviformis</i> C. et M., 1914.
<i>Platynereis dumerilii</i>	<i>Lecudina pellucida</i> ou espèce voisine .	10-12 \times 4	8	A 4	<i>Metchnikovella nereidis</i> C. et M., 1914.
<i>Fridericia polychela</i> .	<i>Monocystis</i> (? <i>Selenidium</i>) mitis	(?) 10-12 \times 3-4	12	G k	<i>Metchnikovella hessei</i> Mesn., 1915.
<i>Ophelia limacina</i> . . .	<i>Selenidium</i> sp.	(?) 15-20 \times 7	(?) 16	H k	<i>Metchnikovella selenidii</i> Aver., 1908.
<i>Audouinia tentaculata</i> .	<i>Selenidium cirratuli</i>	8,7 \times 4,3	(?)	A 5	<i>Metchnikovella minima</i> C. et M., 1914.
<i>Id.</i>	<i>Syca inopinata</i> (= ? <i>Ulivina elliptica</i>) .	20-30 \times 5,5-7	32	A 6	<i>Metchnikovella legeri</i> C. et M., 1914.
<i>Phyllodoce</i> sp.	Grégarine aplatie à contours losangiques	27 \times 4-5 (1)	(?)	A 7	<i>Metchnikovella claparedei</i> C. et M., 1914.
<i>Capitellides giardi</i> . .	<i>Ancora</i> sp.	35-40 \times 2,5	32	B 8	<i>Amphibolys capitellidis</i> C. et M., 1897.
<i>Capitella capitata</i> . .	Forme en comète	50-60 \times 3	(?)	B 9 a-b	<i>Amphibolys capitellæ</i> C. et M., 1914.
<i>Id.</i> (?)	<i>Ancora sagittata</i> type	80 \times 3,5	(?)	B 9 c	<i>Id.</i> var. <i>longior</i> n.
<i>Lumbriconereis tingens</i> .	<i>Ophioidina</i> (= ? <i>Lecudina</i>) <i>elongata</i> ou espèce voisine	70-80 \times 4,5	"	B 10	<i>Amphiacantha longa</i> C. et M., 1914.

(1) Épaisseur mesurée au rendement médian.

(2) Grossissement : 1.250. D. environ, sauf pour la figure Hk.

ÉVOLUTION. — S'il est relativement facile de caractériser les kystes, il est beaucoup plus difficile de se faire une idée précise de l'évolution qui aboutit à ces formations. Nous avons, à cet égard, dès 1897, recueilli un certain nombre de données concernant notre espèce type, *M. spionis*, parasite d'une grégarine aplatie, de grande taille, qui se prête particulièrement bien à l'observation. Nous aurions voulu les compléter; nous avons malheureusement été mal servis par les circonstances (et c'est une des raisons qui nous ont fait différer si longtemps la publication de notre mémoire *in extenso*) : la grégarine en question était parasitée surtout en un point de l'habitat de l'Annélide-hôte et quand, à plusieurs reprises, les années suivantes, nous avons voulu reprendre notre étude, les *Metchnikovella* avaient à peu près complètement disparu. Les matériaux d'étude fournis par les autres *Metchnikovellidæ* se sont montrés moins favorables. Pourtant, l'étude récente que nous avons pu faire d'une seconde espèce de *Metchnikovella* de la grégarine de *Spio martinensis*, nous a permis de corroborer certaines de nos conclusions.

Chez cette Grégarine, comme d'ailleurs chez toutes les autres espèces, le parasitisme se décèle par l'existence de plages claires, qui tranchent au milieu du cytoplasme, toujours plus ou moins granuleux. Ces zones sont généralement arrondies, à contours plus ou moins diffus. Le noyau de la Grégarine est toujours présent; il est parfois refoulé de sa position normale.

Chez la Grégarine parasitée par *M. spionis*, les stades végétatifs du parasite se traduisent, non seulement par des taches claires, mais encore par une sorte de réseau à l'intérieur du cytoplasme (fig. C, 1 et 2).

A cela, à peu près, se bornent les constatations à l'état frais. En examinant avec soin, à l'immersion, des Grégaires écrasées, on ne distingue pas de limites nettes aux taches ou traînées claires. A leur intérieur, on constate la présence de corps arrondis, un peu réfringents. Il nous avait paru que ces corps étaient parfois groupés par deux, dont l'un plus petit que l'autre, et nous avons pensé à une multiplication par bourgeonnement (nous en avons parlé dans notre note préliminaire). Nous devons dire que nos observations, sur préparations colorées à l'hématéine, tant pour *Metchn. spionis* que pour les autres

espèces, ne nous ont rien fourni à l'appui de cette observation.

Ces corps arrondis, plus ou moins réfringents, assez isolés les uns des autres, correspondent probablement aux cellules que l'on observe sur les coupes de *Spio* contenant des Grégaires parasitées par *M. spionis*. Les figures 1, 2 et 3 de la planche donnent une idée des aspects observés dans les cas des traînées cytoplasmiques. On a des cellules en files linéaires, arrondies, mesurant 2μ de diamètre, et renfermant à leur intérieur une petite masse de chromatine bien compacte. Ces cellules sont en multiplication active et on observe un certain nombre de stades : plaques équatoriales assez bien caractérisées, avec fuseaux achromatiques ; quelques diasters. Il s'agit sans doute de mésomitoses, comme c'est le cas chez un grand nombre de Protistes. Averinzew (*l. c.*) figure des promitoses dans la schizogonie de sa *Metchnikovella* (cf. Amibes du type *limax*).

Le reste des traînées ne se colore généralement pas ; il correspond sans doute à une zone où le cytoplasme granuleux de la Grégarine se trouve solubilisé sous l'action des cellules parasitaires. Parfois cependant, les traînées apparaissent comme des bandes prenant plus fortement l'hématéine que le protoplasme grégarien ; mais, en pareil cas, on ne distingue plus de noyaux nets, et nous pensons que l'on se trouve alors en présence de parasites en dégénérescence chromatolytique, et non, — hypothèse qui peut aussi venir à l'esprit — de stades prékystiques.

Un pareil état végétatif s'observe, sous des aspects un peu différents, pour les autres espèces, jamais avec la même netteté. Chez *Amphiamblys capitellæ*, on retrouve les mêmes petites cellules (pl. V, fig. 6) ; mais ici, les files parasitaires se trouvent serrées les unes contre les autres, et on a quelque difficulté à les différencier ; d'ailleurs, les kystes se présentent toujours en faisceau assez compact. Pourtant, en y regardant de près, on reconnaît la même disposition fondamentale que chez *M. spionis*.

Chez *M. brasili*, la seconde espèce parasite de la Grégarine de *Spio martinensis*, les états végétatifs se présentent sous forme de plages multinucléées, dont la figure 7 (pl. V) donne une bonne idée ; il semble, dans ce cas, qu'on ait affaire, non

à des agrégats de cellules, mais à des plasmodes. Averinzew figure aussi des plasmodes; ils paraissent présenter des pseudopodes.

Comment passe-t-on de ces états végétatifs aux kystes? Ici, ou bien nos observations présentent des lacunes, ou bien, et c'est ce que nous pensons, les kystes se forment tout simplement par une sorte d'individualisation d'une partie de traînée ou de plage parasitaire, qui s'entoure d'une membrane épaisse.

Il est probable que des états comme celui de la figure 3 (pl. V), où il y a des cellules sur deux files contiguës, conduisent précisément à ces kystes où les éléments que nous avons appelés germes sporaux se trouvent en effet sur deux rangées.

La figure 8 (pl. V), qui appartient à *M. brasili*, montre une Grégarine avec un grand nombre de kystes mûrs et quelques plages, lesquelles, par leur forme, leurs dimensions, le nombre des noyaux, correspondent bien à un état précédant l'enkystement. Et cette figure, rapprochée de la figure 7, laisse facilement supposer comment on passe des états végétatifs aux kystes.

Un autre argument en faveur de notre manière de voir est tiré de la constatation de l'inégalité de dimensions des kystes, et surtout des anomalies que présente *M. spionis*. La figure D (p. 225) donne une idée de ces anomalies, qui étaient surtout abondantes chez l'individu qui a fourni les éléments de cette figure; les formes bifurquées, par exemple, s'expliquent pour le mieux en supposant que l'enkystement a empiété sur deux branches divergentes du réseau.

Enfin, si la constitution des germes sporaux se fait à l'abri de l'enveloppe de kystes aussi simplement différenciés, on conçoit que de pareils germes puissent se former indépendamment des kystes. Or, nous avons souvent noté, chez diverses espèces, en écrasant les Grégarines parasitées, qu'il en sortait des éléments ayant tous les caractères des germes sporaux des kystes, et qui s'étaient sûrement formés en dehors d'eux.

D'après Averinzew (*l. c.*), les cellules qui entrent dans la composition des kystes copuleraient deux à deux avant de devenir des germes sporaux. Ce fait, s'il est confirmé, n'est nullement en contradiction avec les faits que nous avons observés.

MODE DE PÉNÉTRATION. — Il paraît certain que l'infection se fait par le tube digestif de l'Annélide qui absorbe, avec ses aliments, les kystes parasitaires. Soit par dissolution des parois, soit par déhiscence, les germes sporaux sont mis en liberté, et ils pénètrent dans le cytoplasme de la Grégarine, probablement à des stades divers de celle-ci et en particulier lorsque la Grégarine est encore jeune, appendue à l'épithélium intestinal, et que son enveloppe est relativement mince.

Les germes, inclus dans le cytoplasme grégarinien, apparaissent d'abord comme de petites masses, telles que celles représentées planche V, figure 9, en *i*, renfermant à leur centre un grain chromatique bien délimité. Ils se multiplient, ou bien sur place, en donnant ces traînées ou ces plages dont nous avons déjà parlé, ou bien à distance, et l'auto-infection de chaque Grégarine se trouve ainsi réalisée. Mais peut-il y avoir auto-infection, à l'intérieur d'un même tube digestif, pour les diverses Grégarines qui s'y trouvent, ou bien ces Grégarines sont-elles toutes infectées par le ou les kystes venant de l'extérieur? Nous adoptons de préférence cette seconde manière de voir, car nous avons remarqué un certain synchronisme des états observés chez une même Annélide : en général, les *Metchn.* y sont partout à la période végétative, ou bien partout à l'état de kystes. Les Grégarines ne sont jamais très nombreuses chez une Annélide, et on conçoit qu'un ou un petit nombre de kystes suffisent à infecter la majeure partie d'entre elles.

RELATIONS DU PARASITE ET DE LA GRÉGARINE-HÔTE. — L'action pathogène des *Metchnikovellidæ* nous a toujours paru peu importante, au moins en ce qui concerne la phase végétative de la Grégarine ; il n'y a, à l'encontre de cette opinion, que l'observation de Léger concernant la *Metchn.* d'un *Selenidium* (v. p. 230), et nous devons regarder le cas comme exceptionnel. Mais nous croyons que les Grégarines fortement parasitées, qui, comme on le sait, sont des gamontes, sont incapables d'accomplir leur évolution sexuée ; nous n'avons malheureusement aucun document à cet égard. Averinzew prétend que, quand l'infection est légère, la sporulation de l'hôte est possible et que les kystes du parasite sont éliminés en même temps que ceux de la Grégarine.

Le parasite vit aux dépens du cytoplasme de la Grégarine qu'il dissout et raréfie. Mais nous pensons que la Grégarine est capable de lutter contre l'infection, et nous interprétons dans ce sens ces figures, dont nous avons déjà parlé, où les parasites apparaissent comme en chromatolyse.

Un autre fait est encore plus probant : les *Spio* de la région où nous avons découvert notre espèce type étaient abondamment parasités en 1897; quand nous avons voulu, quelques années plus tard, reprendre nos études, la Grégarine était aussi fréquente, mais on ne trouvait plus de kystes de *Metchnikovella*.

AFFINITÉS. — Si le mode de formation des kystes est bien celui que nous supposons, il faut dire que nous ne connaissons chez les Protistes aucun cas analogue. Et cela seul donne aux *Metchnikovellidæ* un caractère spécial qui les isole dans l'ensemble des Protistes.

Les kystes, considérés en eux-mêmes, indépendamment de leur genèse, présentent évidemment des analogies parmi les organismes inférieurs. Ils ressemblent, par exemple, à des asques de Champignons, ou encore aux kystes de certaines Haplosporidies.

Chatton (1) a insisté sur cette ressemblance avec les asques de certaines levures. Il a décrit, en 1913, sous le nom de *Coccidiascus legeri*, une curieuse levure que l'on trouve à l'intérieur des cellules épithéliales de l'intestin d'une mouche *Drosophile* et voisine d'ailleurs du *Rhaphidospora ledanteci* Léger, d'un autre insecte; et il a montré que les asques de sa levure ressemblent beaucoup aux kystes de l'espèce que nous avons appelée depuis *Metchnikovella legeri*. Chatton avait même poussé la comparaison jusqu'aux ascospores, sur germes sporaux, aciculaires chez *Coccidiascus* et peut-être aussi chez certaines *Metchnikovellidæ*, d'après une observation que nous lui avons communiquée, mais que nos recherches ultérieures n'ont pas confirmée. Nous-mêmes, en 1897, avions songé à un rapprochement avec des levures que nous rencontrions dans une autre annélide. Mais, à cette époque, comme aujourd'hui, la genèse probable de nos kystes nous obligea à abandonner cette

(1) CHATTON, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. LXXV, 1913, p. 117.

hypothèse. Nous ne méconnaissons pas, néanmoins, que c'est encore à des asques que les kystes, une fois constitués, ressemblent le plus.

Ces kystes ressemblent aussi à ceux de certaines Haplosporidies, ordre de Sporozoaires, ou plus exactement de Néosporidies, que nous avons créé autrefois (1). Mais, chez *Calosporidium*, par exemple, on passe graduellement d'un état uninucléé à l'état kystique plurinucléé, tandis que, même chez les *Metchnikovellidæ* qui paraissent avoir un état plasmodial, ce sont des territoires plurinucléés de ce plasmode qui s'individualisent pour donner des kystes, sans autre changement que l'épaississement de la paroi et l'individualisation des germes sporaux. Sans nier les rapports des deux groupes, nous ne pouvons donc souscrire à l'opinion d'Averinzew que les Metchnikovellidées sont des Haplosporidies.

Nous avons, en 1897, à la suggestion de Metchnikoff, posé la question d'analogie avec de curieux microbes, décrits par Haffkine en 1890 (2) sous le nom de *Holospora*, qui sont parasites du macro- ou du micronucléus des Infusoires ciliés, et qui sont caractérisés par une multiplication à la fois scissipare et gemmipare et par l'apparition brusque de formes de résistance à aspect réfringent. Mais ces « holospores » ne rappellent pas du tout nos kystes, et nous avons dit que la reproduction gemmipare de nos cellules végétatives est tout à fait douteuse.

La structure nucléaire des *Metchnikovellidæ* ne rappelle pas celle des levures, et fait plutôt songer à d'autres champignons inférieurs, Myxomycètes et Chytridinées, plus particulièrement aux *Plasmodiophoracées*. M. Pinoy, en particulier, a attiré notre attention sur cette ressemblance, en nous renvoyant aux intéressants mémoires de Maire et Tison (3). Mais il faut d'abord faire remarquer que, au moins en ce qui concerne la division nucléaire, les Metchnikovellidées ne seraient pas d'un type uniforme, puisque Averinzew signale une haplomitose là où nous avons observé de la mésomitose. Au point de vue des états végétatifs et de la formation individuelle des spores, le rapprochement entre les deux groupes est possible ; mais le kyste reste

(1) *Arch. zool. expér.*, l. c.

(2) HAFFKINE, *Annales de l'Institut Pasteur*, t. IV, 1890, p. 148.

(3) MAIRE et TISON, *Annales mycologici*, t. VII, 1909, p. 226, et t. IX, 1911, p. 226.

toujours quelque chose de particulier à notre groupe, qui justifie son isolement parmi les *Protistes inférieurs*.

§ III. — DESCRIPTION DES ESPÈCES DE *METCHNIKOVELLIDÆ*

Nous allons donner, dans les pages qui vont suivre, la description, non seulement des espèces que nous avons nous-mêmes observées, mais encore des espèces vues par d'autres auteurs.

1. — GENRE *Metchnikovella* C. et M., 1897, *emend.* 1914.

1. *Metchnikovella spionis* C. et M., 1897, espèce type (fig. A 1, C et D; pl. I, fig. 1-5).

Habitat : *Polyrhabdina brasili* C. et M. de *Spio martinensis*.

Les *Spio martinensis* Mesn. se rencontrent, dans la région du cap de la Hague, dans diverses sortes de sables : sable jaunâtre des grandes anses où les rochers sont rares, sable compact blanc grisâtre cimenté par de l'humus provenant de débris d'algues (sablon). Partout, ces annélides sont parasitées par deux espèces de grégarines : une aplatie, de grande taille (jusqu'à 200 μ) qui ne présente que des mouvements de glissement et que nous avons nommée *Polyrhabdina brasili*, et un *Selenidium*, grégarine nématode, à côtes bien marquées, très mobile.

Les *Polyrh.* des annélides du sable jaunâtre de l'anse d'Escalgrain, à l'O. du cap de la Hague, — et aussi de l'anse de Vauville, — sont parasitées par *Metchn. spionis*. Nous n'avons jamais rencontré cette espèce chez les grégarines des *Spio* du sablon de l'anse Saint-Martin, à l'E. du cap de la Hague ; mais nous y avons observé, en 1917, une autre *Metchnikovella*, que nous décrivons plus loin sous le nom de *M. brasili*.

En 1897, les neuf dixièmes environ des *Spio* de l'anse d'Escalgrain hébergeaient des *Polyrhabdina* ; chez le tiers de ces annélides ainsi parasitées, la plus grande partie des grégarines étaient elles-mêmes parasitées. L'infection peut être très précoce : nous avons trouvé le parasite à divers états dans des céphalins, c'est-à-dire des grégarines jeunes, encore appendues par leur épimérite à l'épithélium intestinal de l'annélide. Les grégarines parasitées se présentent sous des états divers que l'on peut ranger en 3 catégories : type vacuolaire (fig. C, 1) dans lequel on observe des vacuoles claires, tranchant sur le cytoplasme granuleux de la grégarine, à contours irréguliers, plus ou moins arrondies ou ovales dans le sens transversal ; — type réticulé (fig. C, 2) dans lequel le cytoplasme est parcouru, dans tous les sens et dans toute sa masse, par des trainées hyalines, peu réfringentes, d'un calibre sensiblement constant ; — enfin type kystique (fig. C, 3) dans lequel l'entocyte renferme des corps figurés, de forme assez constante, à contours bien marqués, assez réfringents, allongés suivant l'axe de la grégarine en un fuseau mesurant 20 μ à 40 μ de long sur 4 μ de large. Ils peuvent coexister avec les

trainées; ils sont souvent en grand nombre (une centaine environ) et remplissent alors à peu près complètement le volume de la grégarine dont le noyau, dans tous les cas, reste parfaitement intact (1).

Les kystes ont une membrane épaisse qui se laisse difficilement pénétrer par les matières colorantes. Leur portion médiane (sur les $\frac{3}{5}$ de la longueur) est légèrement renflée et renferme des corpuscules nucléés (fig. A, 1 e et pl. I, fig. 4 et 5), en forme de pépin de raisin, bien individualisés, de $2\ \mu$ 5 de long, généralement au nombre de 16, disposés sur deux lignes, sauf aux extrémités (fig. A, 1 d). Les deux bouts du fuseau ont une affinité spéciale pour les colorants qui en imprègnent d'abord la partie axiale. Cette disposition donne aux kystes de *M. spionis* un caractère très spécial dans le groupe, à tel point que nous avons pensé à restreindre le genre *Melchnikovella* à cette espèce. Mais nous y avons renoncé, au moins provisoirement, car d'autres espèces présentent des bouchons polaires dont l'état réalisé chez *M. spionis* n'est probablement qu'une exagération.

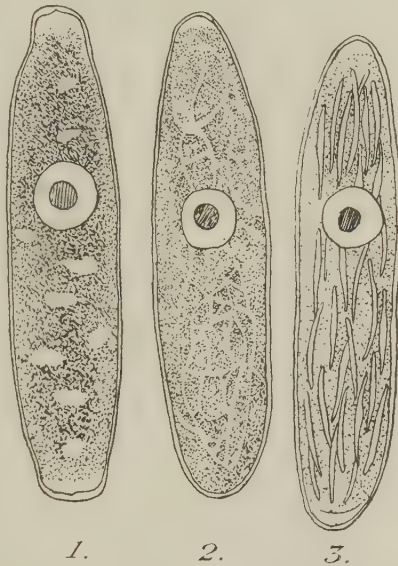


FIG. C. — Grégaires parasitées par *Melchnik. spionis* : 1 et 2, stades végétatifs; 3, kystes. — $\times 400$ environ.



FIG. D. — Kystes anormaux de *Melchnik. spionis* $\times 900$.

d'eux même renfermait des éléments analogues (v. infra) a fait une observation semblable.

Les dimensions des kystes présentent des variations assez notables; la longueur peut aller de 20 à 40 μ . La

(1) Nous avons pourtant observé, tout à fait exceptionnellement, quelques noyaux qui, bien qu'ayant conservé leurs contours, nous ont paru parasités; l'un aux spores. Averinzew

forme peut aussi varier et on observe parfois des individus anormaux, dont une extrémité est soit tronquée, soit bifurquée; la figure D donne divers aspects de ces individus, tous provenant de la même grégarine. Nous avons (p. 220) tiré argument de ces états en faveur de notre conception de la genèse des kystes.

Comme nous avons surtout fait état des figures de multiplication végétative de *M. spionis* pour décrire, dans le chapitre précédent, l'évolution des *Metchnikovellidæ*, nous nous contenterons ici d'y renvoyer ainsi qu'aux figures 1-3 de la planche V. Rappelons aussi que nous avons constaté la

présence d'éléments tout à fait analogues aux germes sporaux en dehors des kystes.

Nous aurions voulu compléter ces recherches et corroborer nos résultats par de nouvelles observations, mais les années suivantes, en particulier en 1905 et 1913, nous avons constaté que l'infection des grégaires des *Spio* de l'anse d'Escalgrain par *M. spionis* avait disparu ou à peu près.

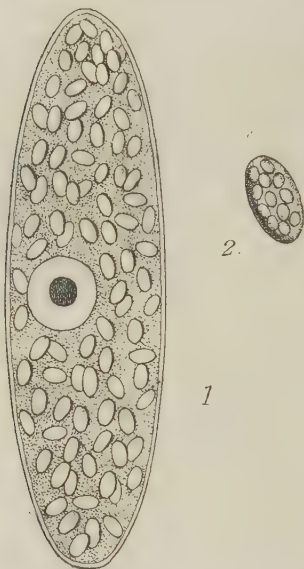


FIG. E. — 1, Grégarine parasitée par *Metchnik. brasili* $\times 350$. — 2, kyste de *M. brasili* $\times 1350$.

2. *Metchnikovella brasili* n. sp. (fig. E et pl. V, fig. 7-8).

Habitat : *Polyrhabdina brasili* C. et *M. de Spio martinensis*.

Dans l'anse Saint-Martin, les *Polyrh. brasili* ne renferment jamais les kystes si caractéristiques de *M. spionis*; leur cytoplasme peut présenter pourtant des taches claires; ce n'est que l'an dernier (1917) que nous avons reconnu qu'il s'agit d'une autre espèce de *Metchnikovella*. Nous la dédions à la mémoire de L. Brasil, dont nous déplorons la disparition prématurée, et

auquel nous avons dédié, en 1914, la grégarine-hôte.

A l'état frais, on distingue, ou bien des taches claires dans le cytoplasme de la grégarine, ou bien un cytoplasme appauvri en granules, dans lequel baignent des corps ovoïdes de $10\ \mu$ sur $5\ \mu$, rappelant assez, par leur forme et leur réfringence, des spores de Microsporidies. Mais leurs dimensions sont relativement grandes, et leur structure (on observe à leur intérieur des éléments au nombre de 12 environ) ainsi que leur genèse écartent cette supposition et montrent qu'on a affaire à une *Metchnikovella* à petits kystes.

On reconnaît en effet, en étudiant des grégaires fixées et colorées sur frottis de *Spio* dilacérés, des plages plurinucléées telles que les représente la figure 7 (pl. V). Ce sont manifestement des portions de ces plages qui s'individualisent, s'entourent d'une membrane épaisse qui ne se laisse plus traverser par les colorants. Vers la fin d'un enkystement, on distingue, bien isolées dans le cytoplasme, de ces masses dont les dimensions, la forme,

le nombre des noyaux, indiquent qu'elles sont des stades prékystiques (fig. 3, *pk*).

L'infection débute, sans doute, dans la grégarine, par de petites masses uninucléées que nous avons observées à plusieurs reprises.

Par les dimensions de ses kystes, *M. brasili* se rapproche surtout de la *M. minima* observée par Léger chez un *Selenidium*; elle en diffère par la forme ovoïde et non cylindrique des kystes.

3. *Metchnikovella incurvata* C. et M., 1914 (fig. A, 2).

Habitat : *Polyrhabdina pygospionis* C. et M. de *Pygospio seticornis*.

En 1898, dans une boue adhérente à la surface des rochers de la Marette (anse Saint-Martin), nous avons rencontré une faune abondante d'Annélides (qui a malheureusement disparu depuis), parmi lesquelles un Spionidien, *Pygospio seticornis*. Ce Spionidien était parasité par une grégarine intestinale, appartenant au genre *Polyrhabdina*, voisine de celle des *Spio martinensis*, mais n'atteignant pas d'aussi grandes dimensions. Les grégarines étaient en général extrêmement abondantes dans le tube digestif de l'Annélide. Nous y avons rencontré des kystes qui nous ont paru devoir être rapportés à deux espèces de *Metchnikovella* : *M. incurvata* et *M. oviformis*.

M. incurvata est caractérisée par des kystes fusiformes, plus larges au milieu qu'aux bouts, légèrement incurvés, mesurant 18 à 22 μ sur 4 μ . Les parois latérales ne sont pas très épaisses; mais, aux deux extrémités, existe une sorte de bouchon qui a environ 1 μ 5 d'épaisseur. Les germes sporaux que contiennent ces kystes sont au nombre de 16; ils ont une forme ovoïde régulière et mesurent environ 1 μ de diamètre. Comme chez *M. spionis*, on constate, en écrasant des grégarines infectées, qu'il existe des spores directement incluses dans le cytoplasme grégarinien; elles paraissent donc pouvoir se former indépendamment des kystes.

Des états végétatifs de *M. incurvata*, nous n'avons vu, et seulement sur le frais, que des vacuoles claires arrondies, de dimensions variables, réparties dans le cytoplasme grégarinien.

4. *Metchnikovella oviformis* C. et M., 1914 (fig. A, 3 et fig. F).

Habitat : *Polyrhabdina pygospionis* C. et M. de *Pygospio seticornis*.

Chez un exemplaire de *Pygospio seticornis* dont les grégarines étaient parasitées, nous avons constaté que les kystes étaient différents de ceux que nous venons de décrire. Ce sont des corps ovoïdes de 14 μ \times 6 μ 5, donc beaucoup plus trapus que les précédents et de forme différente. La paroi est d'une épaisseur uniforme; elle ne présente pas de bouchons polaires. Chaque kyste renferme 8 germes (fig. A, 3). La figure F ci-contre représente une grégarine bourrée de ces kystes.



FIG. F. — Grégarine parasitée par *Metchnik. oviformis* \times 400.

Nous avons cru devoir créer pour ces kystes une espèce nouvelle, *M. oviformis*, différente de *M. incurvata*. *Polyrhabdinu pygosponis*, comme *P. brasili*, est donc parasitée par 2 espèces distinctes de *Metchnikovella*.

5. *Metchnikovella nereidis* C. et M., 1914 (fig. A, 4).

Habitat : *Lecudina pellucida* (Köll.) Ming. (ou espèce voisine) de *Platynereis dumerilii*.

En écrasant, en 1898, un némertien trouvé dans la même boue que l'Annélide qui héberge les deux espèces précédentes, nous avons vu sortir de son tube digestif des grégaires parasitées par une *Metchnikovella*, en même temps que des débris d'une *Nereis dumerilii*. Les caractères de la grégarine, sa présence constatée chez des *N. dum.* de la même zone, nous ont convaincus que nous avions affaire, non à un parasite des grégaires du némertien (dont les sucs digestifs ont d'ailleurs une action dissolvante sur les grégaires), mais à un parasite de grégaires de la *Nereis*.

Cette grégarine est allongée; elle présente une sorte de tête, reliée au reste du corps par une région moins large (cou); sur la région céphalo-cervicale, on distingue des myonèmes transversaux; on observe des mouvements brusques de flexion de la tête et d'une partie du cou à droite et à gauche. Il s'agit d'une espèce du genre *Lecudina* Ming., sans doute voisine de l'espèce type *L. pellucida* (de *Nereis cultrifera*), si elle ne lui est pas identique.

Les *Metchnikovella* de cette grégarine se sont présentées sous forme de kystes (fig. A, 4), de $10-12 \mu \times 4 \mu$, moins ovoïdes et plus fusiformes que ceux de *M. oviformis*, se rapprochant un peu des kystes de *M. incurvata* et présentant, comme eux, des épaissements polaires. On distingue, à l'intérieur de ces kystes, un certain nombre de spores, probablement 8, sur deux rangées.

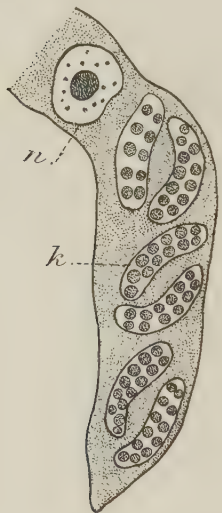


FIG. G. — Fragment de grégarine parasitée par *Metchnik. hessei*: n, noyau de la grégarine; k, kystes du parasite $\times 1250$ (d'après Hesse).

6. *Metchnikovella hessei* Mesn., 1915 (fig. G).

Habitat : *Monocystis* (?) *Selenidium*) *mitis* Leidy de *Fridericia polycheta*.

Hesse a fait connaître, dans sa thèse de doctorat ès sciences, entre autres parasites des Monocystidées d'Oligochètes, un micro-organisme dont il a observé divers stades dans le cytoplasme d'une grégarine d'Oligochète de la Haute-Saône, *Fridericia polycheta*.

Il identifie cette grégarine avec *Monocystis mitis* Leidy, trouvée par cet auteur dans le tube digestif d'autres oligochètes, aux États-Unis, en particulier *Distichopus sylvestris*, et pense que la *Metchnikovella* qu'il observe n'est autre

que celle vue en 1882 par le savant américain. En tout cas, d'après les figures et les descriptions de Hesse (*l. c.*, p. 48 et 49, fig. X et XI), son *Monocystis mitis* nous paraît bien voisin des *Selenidium*.

Hesse a observé des stades mono-ou plurinucléés et des kystes. Certaines figures font penser à une multiplication mitotique des noyaux. Les kystes sont naviculaires comme ceux de *M. spionis* et renferment également de nombreux noyaux disposés en deux séries parallèles au grand axe du kyste. Le noyau de l'hôte n'est pas altéré ; le cytoplasme est absorbé par le parasite, mais il ne paraît pas y avoir de réaction de défense. On aperçoit cependant, autour des kystes, un amoncellement de petits grains chromatoides, qui « sont probablement des grains d'excrétion rejetés par le parasite au moment de la sporulation » (*l. c.*, pp. 234 et 235).

Nous reproduisons ci-dessus une des figures de Hesse, qui montre, dans le cytoplasme de la grégarine, des corps arqués, en forme de banane, mesurant $10-12 \mu \times 3-4 \mu$ et dont les spores, figurées sur deux rangées, paraissent être, d'une façon assez constante, au nombre de 12. Nous croyons, comme Hesse, qu'il s'agit bien d'une *Metchnikovella*. Nous avions négligé de citer cette observation dans notre note de 1914 ; l'un de nous a réparé cet oubli dans une analyse de la note en question (1) et a nommé l'espèce *M. hessei*.

Cette espèce, par ses dimensions et le nombre de ses spores, serait surtout à rapprocher de *M. brasili* ; par sa forme, de *M. selenidii* (*v. infra*). A noter que c'est la seule espèce signalée jusqu'ici en dehors des Annélides polychètes et marines.

7. *Metchnikovella selenidii* Aver., 1908 (fig. H).

Habitat : *Selenidium* sp. de *Ophelia limacina* (baie de Kola).

Dans un mémoire publié en russe et que nous n'avions pas pu consulter en 1914, Averinzew

décrit, sous le nom de *M. selenidii*, un parasite de l'endoplasme de la grégarine du genre *Selenidium*, rencontrée dans l'intestin d'*Ophelia limacina*. Cette espèce se présente d'abord sous forme de petits corps arrondis ou elliptiques. A un stade de développement ultérieur, on a des plasmodes filamenteux (rappelant les trainées de *M. spionis*) et ramifiés, avec un grand nombre de noyaux. La division se fait par promitose (*cf.* divisions des *Vahlkampfa*). Quand on passe à la phase de reproduction, le protoplasme

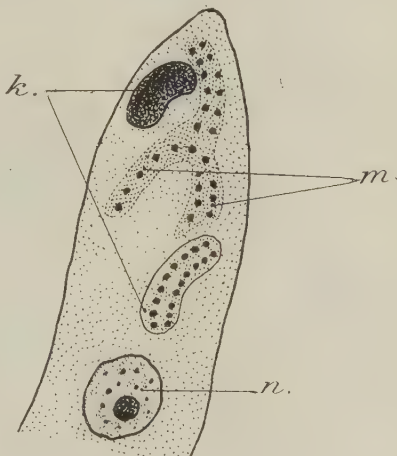


FIG. H. — Fragment de grégarine parasitée par *Metchnik. selenidii* : *n*, noyau de la grégarine ; *m*, stade négatif ; *k*, kyste du parasite $\times 700$ (d'après Averinzew).

(1) Voir *Bull. Inst. Pasteur*, t. XIII, 1915, note de la page 359.

perd graduellement sa substance chromatique, les noyaux deviennent plus gros, s'ordonnent en rangées régulières et le cytoplasme se condense autour des noyaux. Les cellules ainsi individualisées copuleraient deux à deux (les figures de l'auteur ne nous paraissent nullement convaincantes) et le parasite entier se fragmente et s'enkyste. Chaque cellule du kyste est une spore. Une extrémité de la paroi kystique présente un épaississement qui se colore

avec l'hématoxyline et sert de couvercle aux spores.

La figure H ci-dessus montre un fragment de grégarine avec un plasmode et deux kystes (l'un d'eux laisse voir les spores) de *Metchnikovella*. Les kystes très arqués, mesureraient $15-20 \mu \times 7 \mu$ et renfermeraient 18 à 20 spores (? ou 16) elliptiques, de 2μ de long.

Le noyau de la grégarine, conformément à la règle, est intact. Pourtant, l'auteur a observé un noyau rempli de spores du parasite (cf. *M. spionis*).

Les kystes seraient, au moment de la sporulation de la grégarine, contenus dans les kystes de celle-ci et éliminés avec eux à l'extérieur.

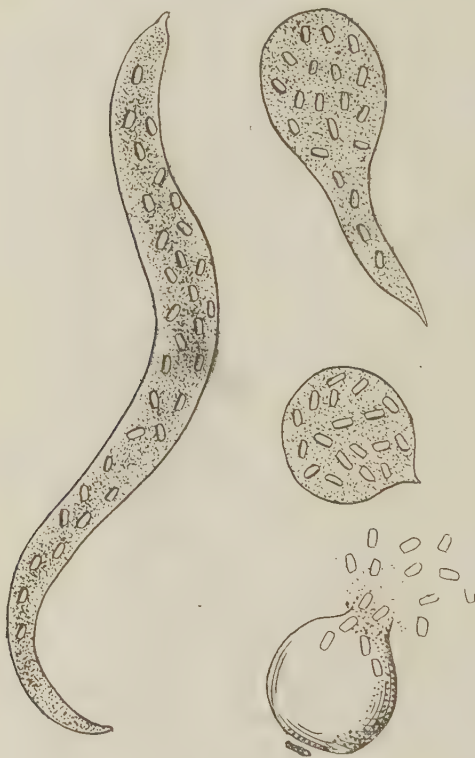
8. *Metchnikovella minima* C. et M., 1914 (fig. A, 3 et fig. I).

FIG. 1. — Stades divers de la mise en boules et de l'éclatement du *Selenidium* parasité par *Metchnik. minima* $\times 230$ (?) (d'après Léger).

Habitat : *Selenidium cirratuli* (R. Lank.) Ming. d'*Audouinia* sp. (probablement *A. tentaculata*).

Nous avons créé cette espèce pour les formations découvertes par Léger dans le cytoplasme de grégaires pour lesquelles il a créé le genre *Platy-cystis* (mais qui doivent être rangées dans les *Selenidium* de Giard), et qu'il a rencontrées dans le tube digestif d'*Audouinia* (très probablement *A. tentaculata*), pêchées à Belle-Isle en mer. Il s'agit sans doute de *Selenidium* (*Polyrhabdina*) *cirratuli* (R. Lank.) Ming.

Léger a observé des mouvements très vifs de la grégarine parasitée, puis sa mise en boule, suivie d'un éclatement de la boule (fig. I). Les corpuscules, ainsi mis en liberté, mesuraient $8 \mu 70 \times 4 \mu 30$; ils étaient très réfringents, avec une paroi épaisse, et renfermaient une vingtaine de granulations. En



raison de cette épaisse paroi et de leur forme générale, ces formations nous paraissent être des *Metchnikovella*; mais il convient de faire quelques réserves en raison de leur petite taille et surtout du nombre des granulations qui correspondraient à des spores particulièrement petites.

Brasil et Fantham disent avoir observé des parasites analogues chez les *Selenidium* de Phascolosomes; malheureusement ils se sont bornés à les signaler. Pour notre part, nous n'avons jamais observé de kystes chez nos parasites de *Selenidium* (v. *infra*).

Quant au phénomène si curieux de la mise en boule, suivie de l'éclatement de la grégarine, nous l'avons observé aussi chez des *Selenidium*, mais ils étaient parasités par des microbes sûrement d'une autre nature que les *Metchnikovella*.

9. *Metchnikovella legeri* C. et M., 1914 (fig. A, 6 et fig. J).

Habitat : *Sycia inopinata* Lég. d'*Andouinia tentaculata*.

Nous avons nommé ainsi, la dédiant à L. Léger, la *Metchnikovella* découverte par ce savant chez une autre grégarine des *Andouinia* de Belle-Isle en mer. Cette grégarine, que Léger a baptisée *Sycia inopinata*, et qui est probablement identique à l'*Olivina elliptica* de Mingazzini, a des sporadins formés de deux parties séparées par une cloison, que Léger a assimilées aux protomérite et deutomérite des Grégarines tricystidées.

Léger a décrit, sans en reconnaître la véritable nature, dans le deutomérite de la grégarine, des formations de $32\ \mu \times 6\ \mu$ (fig. J), assez fortement arquées, à paroi très nette, assez épaisse et réfringente, surtout aux deux extrémités, renfermant des granulations plus ou moins serrées. Nous avons retrouvé les mêmes formations chez des *Sycia* d'*Andouinia tentaculata* de l'anse Saint-Martin. Les kystes (fig. A, 6), d'après nos mensurations, auraient 20 à 30 μ sur 5 μ à 7 μ ; les variations de taille sont donc assez grandes. Ils sont incurvés comme l'indique Léger; à chaque extrémité, on observe un épaississement de la paroi comme chez les *M. incurvata* et *nereidis*. A l'intérieur, on distingue un grand nombre de sphères assez réfringentes; il y en a au moins 32, sur 2 rangs aux extrémités, sur 3 et même plus de rangs au milieu.

Comme Léger, nous n'avons observé de kystes que dans le deutomérite; mais nous avons constaté en plus que, parfois, le protomérite renferme des masses irrégulières remplies de corps qui paraissent identiques aux spores des kystes. Cette production de spores est donc ici clairement indépendante des kystes; suivant que la *Metchnik.* évolue dans le deut- ou le protomérite, il y aurait production ou non de kystes.

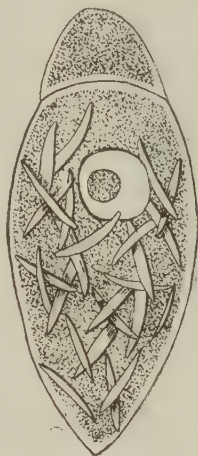


FIG. J. — Grégarine parasitée par *Metchnik. legeri* $\times 350$ (d'après Léger).

10. *Metchnikovella* (?) *claparedei* C. et M., 1914
(fig. A, 7 et fig. K).

Habitat : Grégarine (g? sp?) de *Phyllodoce* sp?

Nous avons dit (p. 209) que Claparède est, à notre connaissance, le premier qui ait observé des *Metchnikovella*. Il les a vus dans une grégarine de forme losangique, trouvée chez une *Phyllodoce* sp? des îles Hébrides. Cette grégarine, d'assez grande taille (0 mm. 11), qui serait à revoir, est peut-être à rapprocher des *Ophioidina*, telles que *O. elongata*, qui ont la même forme générale losangique (extrémité antérieure pointue).



FIG. K. — Grégarine parasitée par *Metchnik. claparedei* $\times 320$. — À côté, kyste isolé, plus grossi (d'après Claparède).

Les formations, vues par Claparède chez toutes les grégarines qu'il a observées et regardées par lui comme des spores de la grégarine (pseudo-navicelles), sort certainement des kystes de *Metchnikovellidæ*; mais nous ne les classons qu'avec réserves dans le genre *Metchnikovella*, car, d'après la figure de Claparède, la largeur (sauf au renflement médian qui a pu être exagéré dans le dessin) n'est que le dixième de la longueur. L'espèce pourrait donc se rapprocher soit des *Amphiamblys* si réellement les extrémités sont arrondies comme l'indique Claparède, soit même, si les extrémités sont en pointe, des *Amphiacantha* : la seule espèce connue parasite une *Ophioidina* dont nous avons rapproché la grégarine de Claparède. En tout cas c'est une espèce à revoir.

II. — GENRE *Amphiamblys* C. et M., 1914.

1. *Amphiamblys capitellidis* (*Metchnikovella* c. C. et M., 1897) (fig. B, 8).

Habitat : *Ancora* sp? de *Capitellides giardi*.

Peu après avoir, en 1897, découvert *M. spionis*, espèce type de notre genre *Metchnikovella*, nous trouvions, chez une Grégarine (du tube digestif de *Capitellides giardi* des mares à *Lithothamnion* de l'anse Saint-Martin), appartenant au genre *Ancora* — qui serait propre aux Capitelliens — des formations parasitaires qu'il convenait manifestement de rapprocher de *M. spionis*.

Ici, les kystes (fig. B, 8) se présentent sous forme de longs bâtonnets de $35-40 \mu \times 2 \mu 5$, légèrement incurvés, avec, au centre de la courbure, un petit renflement, plus ou moins reconnaissable, et, aux deux extrémités, des parties un peu différenciées, qu'un léger étranglement sépare du reste du bâtonnet (fig. 8, en haut). Ces kystes étaient groupés en faisceau parallèle à l'axe de la Grégarine.

On distingue, à l'intérieur des kystes, des corps arrondis (spores) en deux rangées, le nombre total paraît être de 32. Nous ne savons si ce sont les

spores ou la structure de l'enveloppe kystique qui donnent à certains individus une apparence striée, telle que la représente la figure 8 (en bas).

Nous n'avons observé ce parasite qu'une fois; mais nous avons pu compléter nos observations en étudiant l'espèce voisine, *Amph. capitellæ*.

2. *Amphiamblys capitellæ* C et M., 1914 (fig. B, 9 et fig. L, 10; pl. V, fig. 6).

Habitat : Grégarine en comète de *Capitella capitata*.

Au centre de l'anse Saint-Martin, dans un substratum composé de galets cimentés par une boue riche en débris d'algues, on rencontre de nombreuses *Capitella capitata*, dont nous avons décrit autrefois (1) les parasites, en particulier une Grégarine en forme de comète. L'extrémité antérieure est arrondie et l'extrémité postérieure va en s'atténuant. Cette Grégarine nous paraît à rapprocher des *Ancora*, malgré l'absence des appendices latéraux qui donnent la forme d'ancre; il existe d'ailleurs des types plus trapus que notre forme en comète, mais ayant la même forme générale et qui présentent des ébauches de bras.

Quoi qu'il en soit, nous avons constaté en 1898 et à diverses autres reprises que ces Grégarines en comète renferment, comme le représente la figure L, des kystes disposés en faisceaux d'un plus ou moins grand nombre d'individus. Chacun de ces kystes présente la même forme générale que ceux de *M. capitellidis*, mais nous n'avons pas noté de petit épaississement au centre de la courbure, et les dimensions sont un peu plus grandes, $50-60 \mu \times 3 \mu$. Nous avons cru devoir créer une espèce distincte.

Nous n'avons pu nous rendre compte du nombre et de la disposition des germes renfermés dans les kystes. On voit parfois, inclus dans un magma granuleux, des espaces clairs, arrondis, sortes de noyaux, au centre desquels il y aurait un grain; c'est peut-être un stade de début. Le kyste complètement mûr paraît renfermer, comme dans les autres espèces, des corps ovoïdes très réfringents de $3 \mu \times 2 \mu$; ces corps peuvent aussi se former indépendamment des kystes (2).

Des matériaux recueillis ces dernières années nous ont fait connaître les stades végétatifs de cette Metchnikovellidée, qui se traduisent par des espaces clairs, au milieu du cytoplasme grégarinien. Les préparations colorées montrent de nombreux corps arrondis, à contour assez mal limité et renfermant une masse chromatique centrale (pl. V, fig. 6). Ces corps sont



FIG. L. — Grégarine parasitée par *Amphiamblys capitellæ* $\times 600$ environ.

(1) MESNIL et CAULLERY, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. L, 20 nov. 1897, p. 1005.

(2) Nous avons cru observer, anciennement, des germes allongés, aciculaires, de 15μ (M. Chatton y a fait allusion dans une note sur *Coccidiascus legeri*); mais nos observations ultérieures ne nous ont pas apporté de confirmation.

souvent alignés, disposition qui nous paraît en rapport avec la forme en bâtonnet des kystes.

En septembre 1905, chez une *Ancora sagittata* typique trouvée chez un Capitellien du sablon (c'est-à-dire d'habitat différent de l'espèce précédente) et qui diffère à certains égards de *Capitella capitata*, nous avons observé un faisceau de 25-30 kystes, longs de $80\ \mu$ sur $3\ \mu\ 1/2$, par conséquent de dimensions supérieures à ceux de *M. capitellæ*, mais offrant le même aspect (fig. B, 9 c); un seul de ces kystes montrait, au centre de la concavité, un petit épaississement. Même à l'immersion, nous n'avons rien distingué de net à l'intérieur de ces kystes; on a l'apparence d'une double striation losangique, donnant l'impression que les spores sont allongées.

Provisoirement, nous créerons la variété *longior* de *M. capitellæ* pour ces kystes (1).

III. — GENRE *Amphiacantha* C. et M., 1914.

Espèce unique : *Amphiacantha longa* C. et M., 1914

(fig. B, 10).

Habitat : *Ophiodina elongata* Ming. (ou espèce voisine) de *Lumbriconereis tingens*.

Cette Metchnikovellidée est d'un type tout à fait particulier, en raison de ses kystes, dont les bouts, au lieu d'être arrondis comme chez les *Metchnikovella* proprement dits ou les *Amphiamblys*, sont très effilés. Nous avons dû créer pour elle un nouveau genre que nous avons appelé *Amphiacantha*.

Nous n'avons malheureusement pu étudier cette curieuse espèce qu'à l'état frais. Nous ne l'avons observée qu'une fois, le 5 août 1906, parasitant les Grégarines d'un Eunicien, *Lumbriconereis tingens*, de l'anse Saint-Martin. Cette Grégarine est assez allongée et ses deux extrémités sont pointues, la partie large du corps, où se trouve le noyau, est beaucoup plus voisine de l'extrémité antérieure que de la postérieure. Elle rentre dans le genre *Ophiodina* Ming., Grégarine monocyttidée, dont les limites avec le genre *Lecudina* sont à préciser, et est une espèce voisine de *Oph. elongata* Ming. de *Lumbriconereis sp.*

On trouve, dans le cytoplasme des Grégarines parasitées, des fuseaux très allongés de $70-80\ \mu \times 4\ \mu\ 5$, généralement droits, mais parfois incurvés ou mieux légèrement tordus. On remarque une certaine inégalité de taille de ces fuseaux. Les germes contenus à l'intérieur paraissent être en nombre variable; dans quelques cas, ils sont très nombreux, plus de 100.

Une étude cytologique des stades végétatifs eût été très désirable pour préciser les affinités de cette Metchnikovellidée, aberrante par ses kystes. Mais nous manquons de documents à cet égard; les matériaux que nous avons mis de côté ne nous ayant fourni aucune indication en raison de la mauvaise conservation du tube digestif de l'annélide.

(1) Cecconi (*Archiv. f. Protistenk.*, t. VI, 1905) signale, en note (p. 238) de son mémoire sur la grégarine en ancre des *Capitella capitata* de Naples, l'existence d'une *Metchnikovella*. On peut se demander si les figures 8 et 9 de sa planche ne représenteraient pas des stades végétatifs.

§ IV. — AUTRES PROTISTES PARASITES DE GRÉGARINES

Nous avons eu l'occasion, dans la partie historique de ce mémoire, de montrer qu'il existe d'autres parasites de grégaires que les Metchnikovellidées. Il nous reste à les passer rapidement en revue en faisant connaître nos observations personnelles.

1. MICROSPORIDIÉS. — Nous donnons la première place aux parasites découverts par Léger et Duboscq chez une grégaire de crabe, *Frenzelina conformis*, et chez une grégaire d'Ascidie, *Lankesteria ascidiæ*; ils ont rapporté l'un et l'autre protiste aux Microsporidiés, en se basant sur la structure des spores, dont, pour la première espèce au moins, ils ont pu observer le filament polaire dévaginé.

Il est possible que d'autres microsporidiés, parasites de grégaires, aient été vues par miss Porter chez *Mesogregarina amaroucii* d'une autre Ascidie et par Averinzew chez une grégaire de Némerlien. Pour notre part, nous ne pensons pas avoir rencontré de ces micro-organismes.

2. PARASITE DE *Polyrhabdina spionis* (?) (pl. V, fig. 9-10). — En examinant un frottis coloré du Spionidien du sable, *Scolecopsis ciliata*, nous avons constaté que la *Polyrhabdina* (espèce très voisine de *P. spionis* Köll., parasite de *Scolecopsis fuliginosa*) de notre annélide était parasitée; nous n'avions aucune observation sur le frais, et quand nous avons voulu, une autre année, combler cette lacune, l'annélide avait disparu de la station.

La figure 9 donne une idée des formes végétatives du parasite. On distingue (i) des grains chromatiques isolés et entourés d'une mince couche protoplasmique, sans doute éléments de propagation de l'infection dans le cytoplasme de la grégaire, et des masses plurinucléées avec cytoplasme assez chromophile et noyau vésiculeux renfermant un gros caryosome moyennement chromatique. Tantôt ces masses sont globuleuses, tantôt en traînées filamenteuses simples ou ramifiées (fig. 9'); la chromatine est parfois condensée en une plaque équatoriale.

La figure 10 représente une grégaire écrasée, où l'on reconnaît encore le noyau, et qui est bourrée de corps ovoïdes,

de 3μ environ de long, qui ont bien pris le colorant (hémalum) et qui laissent distinguer à leur intérieur une masse chromatique, plus ou moins allongée suivant l'axe du parasite. Chez une autre grégarine, il existait, en plus de ces petits corps, quelques masses ressemblant aux formes végétatives, mais

où la chromatine nucléaire était plus condensée et plus colorée (fig. 10'). Ces masses représentaient sans doute des sporontes, par opposition aux autres qui seraient des schizontes.

Les phases végétatives ne sont pas sans rappeler les Microsporidies; mais les petits corps ovoïdes nous paraissent différer nettement des spores de Microsporidies, et rappeler plutôt les Haplosporidies de la famille des *Haplosporidiidæ* ou des *Bertramiidæ*. De nouvelles recherches sont nécessaires pour préciser.



FIG. M. — 1, *Selenidium* parasité par *Bertramia selenidicola* $\times 650$; — 2, amas parasitaire isolé $\times 700$; — 3, morula plus grossie ($\times 1250$).

3. PARASITES MÛRIFORMES DES *Selenidium* (fig. M). — Nous avons observé, chez les *Selenidium* du même type, de l'intestin de *Spio*

martinensis et de *Scolecipis fuliginosa* (1), deux Spionidiens du sable de l'anse Saint-Martin, des inclusions cytoplasmiques, allongées transversalement, et tranchant par leur aspect homogène sur le fond granuleux constitué par le cytoplasme de la grégarine. On reconnaît ainsi, à un faible grossissement, l'existence de grégarines parasitées. A un grossisse-

(1) CAULLERY et MESNIL, *Travaux du Laboratoire de Wimereux*, t. VII, 1899, p. 88.

ment plus fort, et aussi après écrasement du *Selenidium*, on reconnaît que les inclusions sont le plus souvent occupées par des amas de petites boules sphériques, disposées en 2 rangées; chaque sphère mesure $2\mu\text{ à }3\mu$ environ de diamètre et renferme un grain central de chromatine (fig. M).

On a là, somme toute, un aspect qui diffère, par l'absence de kystes, des Metchnikovellidées, observées chez d'autres *Selenidium*, et qui n'est pas sans rappeler les *Bertramia* (ordre des Haplosporidies).

Par mesure d'ordre et d'une façon tout à fait provisoire, nous désignerons ces parasites mûrifformes sous le nom de *Bertramia selenidicola*.

4. PARASITE DU *Selenidium* « EN VIRGULE » DE *Cirratulus cirratus*. — Chez le *Selenidium* de *Cirratulus cirratus* que nous avons appelé autrefois « en virgule » (1), et que nous appellerons aujourd'hui *Selen. virgula*, nous avons trouvé aussi des inclusions parasitaires. Souvent, le cytoplasme de la grégarine est rempli de petites boules, isolées les unes des autres, et pourvues chacune d'un noyau pariétal. Fréquemment, les boules sont alignées en longues files comme dans *Metchn. spionis*; mais nous n'avons jamais observé de kystes. Nous rapprochons ce parasite des précédents. La différence de distribution dans la grégarine peut tenir à des causes mécaniques telles que la résistance plus grande du cytoplasme à la propagation des parasites dans les *Selenidium* des *Spio* et *Scolecopsis*, d'où un obstacle à la dissémination des éléments parasitaires. Nous ne croyons pas qu'il s'agisse là de stades végétatifs de Microsporidies, car, malgré le grand nombre de *Selenidium* de *Cirratulus* parasités vus par nous, nous n'avons jamais observé les spores caractéristiques des Microsporidies.

5. BACTÉRIES (?) PARASITES DES GRÉGARINES. — Nous avons noté, dans notre historique, que Hesse et Léger avaient signalé des bactéries parasites de grégarines; il semble que les unes détruisent la grégarine, tandis que d'autres sont tolérées. On conçoit qu'une culture pure de ces microbes, permettant de nous fixer sur leurs affinités, n'ait pu être obtenue.

(1) Travaux du Laboratoire de Wimereux, l. c., p. 83.

C'est aussi aux Bactéries que nous rapportons les infections, ou plus exactement les phénomènes pathologiques, que nous avons observées chez deux *Selenidium*.

Dans le gravier de la Marette (anse Saint-Martin), vivent des *Scoloplos mülleri* parasités par un *Selenidium*. Comme chez les *Selenidium* observés par Léger (v. p. 230), nous avons constaté une mise en boule de la grégarine; on distinguait à son intérieur de petits granules animés d'un vif mouvement brownien; puis la boule crevait et les petits granules (? bactéries) étaient mis en liberté. Une fois, le *Selenidium* d'une autre annélide, *Amphiglene mediterranea*, nous a offert le même spectacle. Malheureusement, toutes ces observations ont été faites à l'état frais; quand, une autre année, nous avons voulu reprendre l'étude de la dégénérescence du *Selenidium* de *Scoloplos*, nous avons constaté que ce parasite avait disparu complètement.

Rappelons enfin, pour mémoire, l'énigmatique *Hyalosphæra gregarinicola* de Dogiel et concluons qu'il existe, en dehors des Metchnikovellidées, toute une variété de Protistes parasites des grégaires, dont la nature a besoin d'être précisée et au sujet desquels nous n'avons d'autre prétention ici que d'appeler l'attention des chercheurs.

EXPLICATION DE LA PLANCHE V

Toutes les préparations ont été colorées à l'hémalum, généralement suivi d'éosine. Dans les figures où le noyau de la grégarine est représenté, il est désigné par la lettre *n*.

FIG. 1-5. — *Metchnikovella spionis* C. et M.

FIG. 1. — Coupe passant par l'axe de la grégarine et montrant les stades végétatifs du parasite sous forme de trainées de cellules. G = 820.

FIG. 2. — Coupe tangentielle d'une grégarine montrant quelques cellules parasitaires plus grossies. *c*, division nucléaire avec plaque équatoriale. G = 1.050.

FIG. 3. — Fragment de coupe d'une grégarine où certaines trainées parasitaires (*a*) sont doubles. G = 700.

FIG. 4. — Coupe de grégarine montrant un certain nombre de kystes de *Metchnikovella*. G = 820.

FIG. 5. — Kyste plus grossi dans lequel on distingue les spores nucléées. G = 1.200.

FIG. 6. — *Amphiamblys capitellæ*. Grégarine en comète de *Capitella capitata*, observée dans un frottis, avec stades végétatifs du parasite. G = 820.

FIG. 7-8. — *Metchnikovella brasili*.

FIG. 7. — Portion d'une grégarine observée dans un frottis, montrant les stades végétatifs du parasite sous forme de plaques multinucléées. G = 820.

FIG. 8. — Portion d'une autre grégarine (frottis) avec des kystes (*k*) non colorés et des stades prékystiques (*p k*) colorés. G = 820.

FIG. 9-10. — Parasite indéterminé de la *Polyrhabdina spionis*
de *Scolecopsis ciliata*.

FIG. 9. — Stades végétatifs; on remarquera en *i* des stades initiaux, qu'on retrouve également chez les *Metchnikovella*. G = 820.

FIG. 9'. — Portion d'un cordon parasitaire montrant des plaques équatoriales. G = 1.050.

FIG. 10. — Grégarine écrasée montrant de nombreuses spores (?) du parasite. G = 820.

FIG. 10'. — Stade (?) prékystique; la chromatine des noyaux est condensée au centre et se colore d'une façon intense. G = 700.



DIAGNOSE PIGMENTAIRE DU BACILLE PYOCYANIQUE

par C. GESSARD.

Dans l'état actuel de la microbiologie l'espèce pyocyannique, en tant que productrice de pigments, dont nous connaissons jusqu'à quatre, comprend trois variétés subdivisées chacune en quatre races. Le présent travail expose cette classification avec les faits sur lesquels elle se fonde; il peut être utile pour authentifier et classer tout germe présumé pyocyannique.

Les races et les variétés se caractérisent dans des milieux de culture différents. Nous devons d'abord considérer ces milieux : le bouillon en premier, puisqu'on l'emploie toujours le premier, sinon le seul trop souvent encore, à l'essai du microbe.

DU BOUILLON EN GÉNÉRAL

Le bouillon, d'usage courant pour la séparation sommaire et la culture banale des microbes qui n'exigent pas de traitement spécial, est d'ordinaire le produit d'une décoction de viande, après macération, où l'on ajoute peptone et sel. On est porté à croire qu'une composition si complexe répond à tous les besoins et que le bouillon ainsi constitué peut être employé seul et remplacer les autres milieux. Pourtant il s'en faut bien qu'en particulier il assure de façon certaine et constante la reconnaissance du bacille pyocyannique, même dans son représentant le plus caractéristique, le type de l'espèce, le germe de race A de la variété pyocyanogène. Rappelons que ce germe possède une double fonction chromogène, c'est-à-dire qu'il fait apparaître de la pyocyanine et du pigment vert fluorescent dans le milieu qui m'a servi à distinguer les races du bacille pyocyannique.

Ce milieu s'obtient par décoction, d'une demi-heure, de

viande de bœuf ou de veau mise en eau froide sans macération préalable, pour un rendement double du poids de viande et sans rien autre que la neutralisation par la soude. Ce n'est non plus qu'un bouillon, qu'on dira simple pour le distinguer du précédent, mais qui diffère notablement de celui-ci par rapport au germe susdit. Tandis qu'il se prête au développement des deux fonctions chromogènes, le bouillon, que j'ai mentionné d'abord en raison de la faveur qu'on lui garde, exalte trop souvent la fonction fluorescigène du bacille au détriment de la pyocyanogène, qui peut être totalement annihilée, auquel cas on n'obtient que du vert fluorescent dans la culture, nul indice par conséquent qu'il s'agisse de la pyocyanique plutôt que d'une quelconque des espèces qui ont cette même fonction fluorescigène, commune à un si grand nombre. D'autre part dans le bouillon simple lui-même, de pareilles équivoques et une incertitude pareille résultent des aspects qu'y montrent les cultures des deux races où la pyocyanine fait défaut : F, qui n'a que la fluorescence; S, qui est sans pigment. On trouve aussi que, s'il n'est impropre à aucun des pigments pyocyaniques, le bouillon est, comme il est dit plus loin, pratiquement borné aux deux pigments que nous avons cités; de plus, la séparation de ceux-ci suivant la technique habituelle est gênée par l'alcalinité et la viscosité qu'y développe la culture du microbe. Il faut un autre milieu et d'autres données pour déterminer sûrement l'espèce pyocyanique.

DES MILIEUX PEPTONÉS : CARACTÈRES DES VARIÉTÉS

La peptone est toute désignée pour cet objet. Elle a ce premier avantage de ne pas donner de fluorescence même avec le germe le plus fluorescigène en bouillon, en quoi elle favorise la production des autres pigments. Son état physique ni sa réaction n'est sensiblement modifié par la culture; elle n'émulsionne pas, comme le bouillon, le chloroforme qui sert à la séparation de la pyocyanine. J'ai reconnu de bonne heure cette supériorité de la peptone et j'en ai recommandé l'emploi (1).

(1) Nouvelles recherches sur le microbe pyocyanique. Ces *Annales*, t. IV, 1890, p. 88.

Je n'ai aujourd'hui que de meilleures raisons d'y insister.

Une culture en peptone doit toujours être faite en parallèle avec l'épreuve en bouillon, quel que puisse être le succès de cette dernière : car, en plus de la notion de l'espèce, où le bouillon peut parfois suffire, la peptone fournit toujours et est seule en état de fournir la notion de la variété. Peptone pancréatique Defresne en solution aqueuse à 2 p. 100, neutre ou légèrement alcaline, ou cette même solution glycinée à 10 p. 100 et solidifiée par la gélose en tube incliné, constituant le réactif gélose-peptone glycinée(1).

L'ensemencement de ces milieux peptonés, tant liquide que solide, donnera lieu, selon la variété du germe pyocyanique, à certaines des réactions suivantes.

Après un temps variable, une coloration bleue ou bleu vert, sans fluorescence, apparaît d'abord sous forme de zone à la surface de la solution de peptone, puis s'étend peu à peu à tout le liquide. Le milieu solide se colore de même progressivement. C'est seulement au bout d'un long temps que la coloration subit la transformation dont il sera parlé plus loin. Dès lors qu'elle est aussi uniformément répandue, favorisant d'autant les réactions caractéristiques de la pyocyanine, qui doivent toujours être recherchées, elle révèle à première vue la variété pyocyanogène, Pe (2), dont on peut dire à plus d'un titre qu'elle est la première : étant la variété qui fut connue d'abord et seule pendant un assez long temps, à laquelle appartient le type de l'espèce (germe faisant pyocyanine et vert fluorescent dans le bouillon et pyocyanine dans la peptone), qui s'identifie avec l'espèce par la synonymie et qui, accrue en certaines façons, fait la base des autres variétés.

C'est d'autre part une coloration rouge brun d'emblée, primitivement en surface, qui envahit progressivement la totalité des milieux peptonés et se fonce en brun, atteignant même le noir à la longue. Un traitement par le chloroforme, battage simple durant quelques secondes pour la solution de peptone, macération d'une heure au plus pour la masse gélosée, doit extraire du bleu de pyocyanine, dissimulé jusque-là sous le

(1) Pour formule et mode de préparation, voir ces *Annales*, t. V, 1891, p. 78.

(2) Ces *Annales*, loc. cit., t. IV, 1890.

pigment sombre en excès, pour faire reconnaître un germe pyocyanique de la variété mélanogène, M(1).

En troisième lieu ce peut être, dans l'eau peptonée, d'abord une coloration jaune, jaune verdâtre, de toute la culture; puis, plus ou moins vite suivant l'aération, le jaune passe au rouge en débutant par une zone à la surface du liquide où l'air a directement accès, et se propageant ensuite à tout le reste. Sur la peptone gélosée c'est, en rapport avec les vicissitudes de l'aération, des couches de jaune et de rouge entremêlées, jusqu'à ce que la masse totale de la gélose, comme par une maturation de proche en proche, soit devenue uniformément rouge, de nuance de vin ou de groseille. Les mêmes traitements chloroformiques que ci-dessus, respectivement appropriés aux milieux liquide et solide, doivent donner le même résultat qu'en M, pour qu'il soit permis de conclure à la variété érythrogène, E(2), du bacille pyocyanique.

Ainsi trois germes se distinguent, en culture dans les milieux peptonés, par des couleurs aussi tranchées que le bleu, le rouge brun foncé et le rouge vif. Ils ont pour propriété commune d'y faire de la pyocyanine : exclusivement, dirait-on du premier, à défaut d'une observation suffisamment prolongée et faute des notions qui seront exposées dans un prochain chapitre; en quantité relativement restreinte, à ce qu'il paraît pour les deux autres germes, avec qui le chloroforme est nécessaire pour déceler dans leurs cultures la pyocyanine, plus rare, sous le pigment associé qui la masque. La proportion de bleu produite est du reste sans importance. Ce qui importe, c'est cette signature de l'espèce dans des cultures d'aspect si différent de la culture pyocyanique ordinaire, dont la première variété est le type : par quoi se justifie la conception de variétés distinctes d'une espèce unique. La peptone, qui révèle ainsi l'espèce invariable et identique à elle-même sous cette diversité de variétés, en même temps qu'elle rend manifestes ces variétés, peut être dite à bon droit le milieu spécifique du bacille pyocyanique.

(1) Variété mélanogène du bacille pyocyanique. Ces *Annales*, t. XV, 1901, 817.

(2) Variété érythrogène du bacille pyocyanique. *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, t. 46, 1917, p. 4071.

DU BOUILLON SIMPLE : CARACTÈRES DES RACES.

Des trois variétés ainsi caractérisées en peptone, comment les germes vont-ils se comporter dans le bouillon de la formule que j'ai dite? Rappelons d'abord que quatre races y ont été constituées, anciennement déjà, au profit de la variété pyocyanogène, qui était alors la seule variété connue (1).

Le bouillon simple, et nul autre, est propre à la manifestation des caractères de ces races : elles diffèrent par les proportions des deux pigments, pyocyanine et vert fluorescent, que ladite variété produit en bouillon. Quant aux variétés mélanogène et érythrogène, venues plus récemment à notre connaissance, leurs germes, depuis une durée déjà longue de passages en milieux artificiels, ne donnent pas leurs pigments caractéristiques dans le bouillon; ils n'y font voir que ces deux mêmes pigments, qui leur sont communs avec la variété pyocyanogène, dans les mêmes rapports entre eux que chez celle-ci, rapports variés qui, respectivement fixés dans des germes distincts et perpétués dans la descendance de ces germes, correspondent bien à autant de races différentes. Les divisions que j'ai marquées pour la première variété sont donc applicables aux deux autres. En sorte qu'on peut trouver dans la nature, ou réaliser par quelque artifice comme j'ai fait autrefois pour la variété Pe, ou voir apparaître dans l'évolution des cultures en série, pour ces variétés M et E, les races connues de la variété Pe, qui sont, à partir du type le plus complet, la race A, qui fait pyocyanine et vert fluorescent: la race P, qui fait pyocyanine sans fluorescence; la race F, qui fait vert fluorescent sans pyocyanine; la race S, qui ne fait ni pyocyanine ni fluorescence.

Toutefois la pyocyanine, dans la race P, n'est seule qu'en apparence; en réalité, elle est toujours accompagnée, à défaut de la fluorescence verte, du pigment jaune verdâtre, peu perceptible à l'inspection directe et par suite indifférent pour le diagnostic précoce, mais qui prend plus d'importance à mesure

(1) Des races du bacille pyocyanique. Ces *Annales*, t. V, 1891, p. 65.

que la culture vieillit, et dont il sera plus longuement question au chapitre suivant. Les cultures fluorescentes prennent une teinte feuille morte en vieillissant; la culture pyocyannique, une coloration rouge, sur laquelle je reviendrai au même chapitre.

Si, selon l'habitude, on commence par la culture en bouillon l'étude du germe à déterminer, c'est, suivant la race, l'un ou l'autre des résultats énoncés qu'on obtiendra; or il est évident que, seules, les données de A et de P où figure la pyocyanine permettent de prononcer sur l'espèce du microbe. Quant au germe de race F, il n'est pas possible, comme j'ai déjà dit, sur la seule culture en bouillon, de décider s'il s'agit de l'espèce pyocyannique ou de quelque autre de celles qui font également de la fluorescence dans ce milieu; et pour le germe pyocyannique de race S, l'incertitude est plutôt accrue par le nombre infini d'espèces microbiennes sans pigment où il se trouve confondu; d'où la nécessité dans ces deux cas, pour connaître l'espèce, de faire une culture en peptone. En peptone, surtout glycinée comme est le réactif gélose-peptone, tous les germes pyocyaniques, de quelque race qu'ils soient et quoi qu'ils fassent conséquemment en bouillon, se retrouvent à produire de la pyocyanine; à quelque variété aussi qu'ils appartiennent, sous la réserve qu'à fin de preuve, avec les autres variétés que la pyocyanogène, le chloroforme supplée l'observation, insuffisante pour découvrir la pyocyanine en quantité réduite et dissimulée. Si, au contraire, on avait débuté par la culture en peptone, il s'ensuivrait inversement qu'on dût recourir à une culture en bouillon pour connaître la race. Il sera donc expédient de mener toujours parallèlement essais en bouillon et en peptone, pour que soient obtenues simultanément les notions d'espèce, de variété et de race.

Espèce et variété auront bien pu être révélées par la simple inspection des cultures en peptone quand il s'agit de la variété pyocyanogène, encore n'en faut-il pas moins faire la preuve par l'extraction de la pyocyanine à l'aide du chloroforme. C'est une pratique qui doit entrer dans l'habitude, et qui s'impose d'autant mieux qu'on aura constaté les colorations imputables aux deux autres variétés. Les pigments spéciaux de celles-ci, reconnus en cultures peptonées, ne constituent jamais que des présomptions en faveur de l'espèce pyocyani-

que, et sur le seul fondement qu'ils n'ont été observés jusqu'ici que chez des représentants de cette espèce. Rien n'autorise cependant à exclure l'hypothèse qu'ils se puissent rencontrer un jour chez quelque autre : l'exemple du pigment vert fluorescent commun à plusieurs espèces doit toujours être présent à la pensée.

Pour ce qui est de ce dernier, d'autre part, dans l'occurrence d'une fluorescence verte en bouillon, on ne s'en remettra pas davantage à la vue seule, si exercée qu'elle puisse être, de discerner s'il y entre quelque mélange de bleu. Toute culture en bouillon passée au vert fluorescent doit être soumise à l'essai par le chloroforme pour conclure en toute certitude à l'espèce pyocyanique, sans préjudice de la culture d'épreuve en peptone, parallèlement conduite, dont je répète qu'il faut se faire une loi.

J'ai dit, au début de ce chapitre, qu'en l'état actuel les germes M et E ne produisent pas les pigments caractéristiques de leurs variétés dans leurs cultures en bouillon. Cependant M. Radais a obtenu dans le bouillon, même exempt de peptone, du rouge brun du bacille mélanogène qu'il fut le premier à étudier systématiquement (1); j'y ai eu, de mon côté, du rouge de l'érythroène. C'était, pour chaque cas, dans les cultures de temps le plus rapproché du puisement des germes dans les milieux d'origine, milieux vivants. Après un certain nombre de passages dans les milieux artificiels, la culture en bouillon n'offrait plus trace de ces pigments. C'est ce dernier état que j'ai décrit plus haut, comme le plus stable déjà depuis un certain temps, et aussi parce qu'il réclame le plus de soin pour le diagnostic pyocyanique, du fait que, le bouillon pouvant ne pas donner d'indication d'espèce, la peptone ne montre rien de plus que le pigment de la variété en cause, sous quoi il faut songer à rechercher expressément le pigment caractéristique de l'espèce. Il n'importait pas moins de rappeler dans cette occasion les aspects primitifs des cultures : des germes nouveau-venus les pourraient reproduire un jour.

Aussi bien c'est une notion devenue banale à force d'être redite et vérifiée dans nombre de travaux de microbiologie : on n'y saurait énoncer un fait, encore moins généraliser tant soit peu, qu'on ne dût aussi vite souligner la contingence et réserver le caractère conditionnel de phénomènes où concourent des milliers de vies en évolution perpétuelle. La présente étude en apporte des preuves nouvelles. Par exemple, on vient de voir le bouillon susceptible des pigments propres aux variétés, que ma description avait restreints aux milieux peptonés. A l'inverse, on pourrait constater, en déviation du schéma que j'ai tracé des variétés M et E, schéma d'ailleurs conforme à une observation réitérée, que de la pyocyanine apparût en peptone, y accompagnant ou devançant même les pigments spéciaux, à la vérité pour peu de temps seulement. D'autre part, le bouillon de la formule que j'ai tout

(1) RADAIS, Sur une nouvelle race de bacille pyocyanique. *Comptes rendus*

d'abord écartée ne fait pas nécessairement obstacle à la production de la pyocyanine, pas plus que la peptone de la marque que j'ai adoptée ne met invariablement à couvert de fluorescence simultanée avec la pyocyanine, quand on y cultive la variété Pe. La variabilité du jeu des réactions colorées dans nos milieux artificiels s'explique trop bien par la diversité dont la vie est capable, alors que la vie n'est pas seulement agissante dans la physiologie du microbe, mais qu'elle domine encore la composition de ces milieux, où entre, comme dans le bouillon de viande, un produit de la vie; où, comme dans la peptone, s'ajoute à cette cause initiale de variation la complication d'une opération de chimie biologique et, qui plus est, de pratique industrielle.

DE LA VARIÉTÉ PYOCYANOGENÈ

Les colorations produites en milieux peptonés par les germes des variétés mélanogène et érythrogène ne changent pas sensiblement avec le temps : elles deviennent seulement plus foncées.

Au contraire, le bleu de la variété pyocyanogène subit une transformation complète. Dans un temps variable avec les conditions de température et d'aération, le bleu, en peptone liquide comme dans la masse gélosée, fait place à un rouge, tout à fait comparable au rouge que donne la variété érythrogène.

Avant tout changement, à la période du bleu uniformément réparti et pur en apparence, si, par le traitement chloroformique approprié, on dépouille le milieu peptoné soit liquide, soit solide, de la pyocyanine qui l'a envahi, l'un et l'autre garde une couleur rouge qui doit faire penser que ce rouge préexistait, offusqué seulement par le bleu intense et prédominant.

Plus tôt, si le même traitement porte sur l'eau peptonée, quand la coloration bleue du début de la culture n'y occupe encore qu'une zone superficielle, l'extraction par le chloroforme de cette faible quantité de pyocyanine ne laisse subsister dans le liquide qu'une teinte jaune verdâtre, mais qui passe en quelques heures au rouge connu des cas précédents, seulement atténué par suite de la dilution plus grande. Jaune et rouge, c'est la succession de teintes que nous a montrée la variété érythrogène. C'est le même pigment en effet, celui que j'ai décrit jadis, quand il m'apparut dans ces mêmes condi-

tions : « troisième pigment, jaune verdâtre, qui passe au rouge avec le temps », à quoi il convient d'ajouter pour compléter la description : pigment associé dans le bacille pyocyanique normal avec la pyocyanine et le vert fluorescent, masqué d'ordinaire par ces deux pigments, et rendu seulement manifeste par les circonstances qui les suppriment, comme la nature du milieu de culture : peptone, qui exclut la fluorescence verte; comme l'extraction par le chloroforme ou le vieillissement, qui atteignent et soustraient la pyocyanine.

De ce qui précède il résulte donc qu'en dernière analyse la variété pyocyanogène, où se rattache le type de l'espèce, ne doit pas au pigment spécifique la coloration finale de ses cultures en peptone et que, du fait que dans celles-ci prédomine en dernier le troisième pigment, ladite variété risque d'être confondue avec la variété érythrogène que ce troisième pigment caractérise.

Au moins la confusion n'est pas à craindre au début, qui montre le bleu quelque temps stable dans un cas; dans l'autre cas, le rouge d'emblée ou de bonne heure substitué au jaune verdâtre initial ou à du bleu qui, s'il en apparaît dans cette culture érythrogène, c'est également pour une courte durée et en faible quantité. Plus tard, quand les rouges pourraient être confondus, c'est encore le temps qui fixera le diagnostic : le temps dans lequel les colorations respectives des cultures des deux variétés auront abouti à une sensible égalité de teinte. Le procès d'oxydation est en effet de vitesse inégale, qui d'un côté développe le pigment rouge à partir du jaune éphémère du début et de l'autre côté fait disparaître le bleu par substitution à la pyocyanine de son dérivé peroxydé jaune, la pyoxanthose : pyoxanthose dont c'est le lieu de dire comment on doit interpréter son rôle dans l'effet de couleur total.

Ce n'est pas substitution pure et simple de sa couleur claire au bleu sombre, qui faisait écran au pigment associé. Mais vraisemblablement, la pyoxanthose, à l'état naissant, satisfait son affinité élective dans le milieu, dont l'alcalinité originale n'a pu que s'accroître avec le développement microbien, et, proportionnellement à la quantité de sa combinaison alcaline, d'un beau violet, qui aura de la sorte pris naissance, elle peut influencer la nuance définitive du rouge des cultures peptonées

de la variété pyrocyanogène. Ces transformation et combinaison des pigments spécifiques dans une culture un peu ancienne font comprendre que leur dissolvant de choix, le chloroforme, ne décèle d'ordinaire trace d'aucun d'eux, même après une macération prolongée avec la gélose rouge.

Je reproduirai ici (I) les réactions de la pyoxanthose, moins connues et moins pratiquées que celles de la pyocyanine; celles-ci se trouveront rappelées par la même occasion. J'en ferai ensuite (II) l'application à la recherche et à la démonstration de la pyoxanthose dans la combinaison où j'ai admis qu'elle était engagée et pouvait contribuer à la coloration finale des cultures.

I. La pyoxanthose s'obtient par oxydation de la pyocyanine. Pour cela, la liqueur bleue que le chloroforme a fournie par traitement d'une culture pyocyanique est agitée avec une eau acidulée (à 1 p. 100, SO^*H^2), ce qui met la pyocyanine en solution acide, rougie en vertu de la réaction caractéristique de ce principe. Cette solution ramenée au bleu par un alcali (NaOH), plutôt en léger excès en vue de l'opération qui suit, est doucement chauffée jusqu'à ce qu'elle vire au violet: c'est la couleur de réaction aux alcalis de la pyoxanthose née de la pyocyanine oxydée par ce traitement. L'addition d'un acide (SO^*H^2) décolore le violet: le jaune de la pyoxanthose se voit au point d'exacte neutralité de la liqueur, qu'un excès d'acide ferait virer au rouge particulier de la réaction de la pyoxanthose aux acides. Jaune ou rouge, c'est-à-dire neutre ou acide, la liqueur agitée avec le chloroforme lui cède la pyoxanthose jaune, que reprendrait, au contraire, au chloroforme une eau alcaline, en reconstituant la solution violette du début. C'est donc l'inverse des réactions de la pyocyanine aux dissolvants, laquelle passe, comme on a vu, de milieu alcalin en chloroforme, auquel une eau acide la reprend, étant assimilable aux bases, alors que la pyoxanthose l'est aux acides.

A propos de ces états successifs, signalons l'adaptation possible à des dosages colorimétriques des solutions de pyocyanine, soit bleue dans le chloroforme, soit rouge, qui a l'avantage d'être plus stable, dans l'eau acidulée, celle-ci représentant intégralement le titre de la solution chloroformique qu'elle dépouille entièrement de sa pyocyanine. Cependant l'évaporation du chloroforme eût d'abord fourni matière à un dosage par pesée en laissant la pyocyanine en nature, à l'état cristallisé.

II. Une culture de bacille pyocyanique type sur gélose-peptone glycinée datant de dix mois et restée d'un beau rouge, mise à macérer dans du chloroforme, ne lui a rien cédé au bout de vingt-quatre heures. Le chloroforme étant alors décanté, la masse gélosée est mise à digérer dans environ 15 cent. cubes d'eau, une demi-heure, au bain-marie bouillant. Après cette opération, un tiers du produit prélevé, agité avec du chloroforme, ne le colore toujours pas. Un second tiers est donc additionné d'acide sulfurique jusqu'à titrer 1 p. 100 et subit le même traitement par la chaleur que précédemment, en même temps que le restant du liquide qui n'a d'addition d'aucune sorte et qui sert de témoin. Après quoi, par agitation avec le chloroforme, ce dernier échantillon ne donne pas plus de couleur que lors du premier essai, cependant que la liqueur acide cède au chloroforme de la pyoxanthose jaune, libérée de la combinaison qui la retenait jusque-là dans le milieu de culture.

DE LA VARIÉTÉ ÉRYTHROGÈNE

Je me suis conformé à l'ordre chronologique de leur découverte pour décrire, dans un précédent chapitre, la variété mélanogène entre les variétés pyocyanogène et érythrogène. Cependant cette variété se distingue nettement par la production de ce pigment rouge brun, souvent foncé jusqu'au noir, que j'ai naguère assimilé aux mélanines d'origine diastasique. Ce caractère lui est particulier et doit la faire mettre à part. Au contraire, tout porte à rapprocher les variétés pyocyanogène et érythrogène. Nous venons de voir notamment que le pigment à terme d'oxydation rouge, qui marque d'un si vif éclat la variété érythrogène, existe et avait été signalé anciennement dans la variété pyocyanogène. Dans l'un et l'autre cas, il est associé au pigment caractéristique de l'espèce.

Il n'y a de différence que de quantité, les proportions de pigment rouge et de pyocyanine sont en raison inverse : suivant la variété, l'un de ces pigments l'emporte sur l'autre, si bien qu'il nous a fallu, pour vérifier leur coexistence, recourir chaque fois au traitement chloroformique, lequel extrait la pyocyanine masquée par le pigment rouge dans la variété érythrogène et enlève la masse de bleu sous laquelle le rouge est dissimulé dans la pyocyanogène.

C'est un effet de ce balancement qui s'observe fréquemment dans les propriétés biologiques, dont la biologie du bacille pyocyanique entre autres offre de nombreux exemples. Ce balancement, que nous retrouvons ici à l'origine des variétés Pe et E, nous l'avons déjà vu dans les cultures en bouillon, où, s'exerçant entre la pyocyanine et le vert fluorescent, il donnait lieu aux races P et F.

Il y a toutefois cette différence dans le cas des races, qu'à la prédominance de l'un des pigments correspond l'abolition complète de l'autre : pyocyanine est sans mélange de fluorescence en P, comme en F fluorescence est sans pyocyanine.

On remarquera à ce propos que si, par une supériorité exaltée des fonctions mélanogène et érythrogène dans leurs variétés respectives, leurs pigments caractéristiques venaient à être pro-

duits d'une façon aussi exclusive, la suppression corrélative de la production de pyocyanine, pourvu qu'elle fût durable et de tous les milieux, aurait pour effet de réaliser ces espèces inconnues jusqu'ici, dont, au chapitre précédent, j'ai envisagé la réalisation éventuelle, réalisation qu'on pourrait attendre aussi bien des recherches expérimentales (1) que des conditions naturelles. Mais avant que ces hypothèses se vérifient, nous sommes mieux autorisés sans doute à concevoir des suites autres et dans un sens différent du balancement en jeu entre les rapports réciproques des pigments.

C'est, par exemple, entre les types extrêmes qui montrent avec les variétés Pe et E la plus grande inégalité des pigments rouge et bleu, une série de types intermédiaires, où des variations de sens inverse dans les quantités de chaque pigment aboutiraient graduellement à leur moindre différence, sinon à leur complète égalité, commune limite des deux variétés.

De ces types intermédiaires il doit en exister déjà dans nos cultures les mieux définies, qui ne sauraient pourtant être homogènes (2), où le procès même de l'évolution vitale, parmi des êtres innombrables en pullulation incessante, est forcément cause de dérogations individuelles à la formule pigmentaire, qui ne traduit jamais que l'action chromogène du germe en nombre prédominant. L'isolement sur plaques en permettrait la découverte et la sélection.

C'est un de ces types, en tout cas, que les circonstances naturelles ont procuré avec le deuxième échantillon de la variété érythrogène venu en ma possession. Le germe a été isolé du pus d'une adénite par M. Ph. Lasseur et a été étudié sous sa direction au laboratoire de bactériologie de l'École supérieure de pharmacie de Nancy par M. Mamelie (3); lequel y reconnut la variété érythrogène et voulut bien me le communiquer. Je

(1) L'expérience vaudrait la peine d'être tentée, dont le succès ne pourrait être sujet à caution, n'y ayant pas d'autre espèce avec un pigment comparable (dans les rouges s'entend); au contraire des microbes du groupe des fluorescents, pour lesquels un semblable essai se pouvait déjà concevoir. (Sur la fonction fluorescigène des microbes. Ces *Annales*, t. VI, 1892, p. 802, note.) Il ne s'agirait en tout cas de rien de moins que de transformations d'espèces.

(2) E. WASSERZUG, Sur la formation de la matière colorante chez le *B. pyocyaneus*. Ces *Annales*, t. I, 1887, p. 581.

(3) A. MAMELIE, Observations sur un nouvel échantillon de *Bacillus pyocyaneus erythrogenes*. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, t. LXXXI, 1918, p. 1137.

l'examinerai en parallèle avec le germe sur quoi j'ai fondé cette variété.

Tout d'abord ce point de ressemblance dans le fait, d'ailleurs fréquent, dû à la moindre compatibilité du bouillon et de la fonction pyocyanogène; celle-ci passe et la fluorescigène subsiste : au cours des cultures de M. Mamelle la race primitive A a dégénéré en race F, comme cela était arrivé dans mes propres séries d'expériences.

Par ailleurs, tandis que mon germe original montre d'abord, sur gélose-peptone glycinée, le mélange de rouge et de jaune verdâtre que l'on sait, c'est-à-dire le pigment de la variété exclusivement, j'ai constaté avec le nouveau germe, sur le même milieu, du bleu vert associé au rouge dès le début de la coloration. Le traitement chloroformique, qui tient compte toujours du bleu qui pourrait être dérobé à la vue, appliqué aux deux cultures parallèlement conduites, a confirmé la notable différence de production de pyocyanine constatée déjà par l'observation directe. Il s'est même rencontré parfois qu'il n'apparût d'abord que du bleu vert, où le rouge survenait bientôt et prédominait à partir du sommet et des bords de la couche gélosée, qui sont les parties les mieux aérées. C'était ainsi l'ordre même de succession des couleurs de la variété pyocyanogène. La différence consiste alors, comme je l'ai déjà dit, dans la précocité et la rapidité du rougissement, tout en faveur de la variété E.

En pareil cas, l'eau peptonée était préférable, pour attester la variété érythrogène, au réactif gélosé, où entre la glycérine, particulièrement favorable à la fonction pyocyanogène : la culture du nouveau germe y restait jaune verdâtre, sans mélange de pyocyanine, jusqu'à ce que se manifestât la zone rouge, prélude du rougissement général; celui-ci et celle-là demandaient plus de temps à venir avec le germe de Nancy. Mais alors, pour réduire les délais où s'achevait la manifestation du pigment caractéristique et pour faire marcher de pair les germes de Paris et de Nancy, s'offrait à point nommé le milieu dont je n'avais pas encore fait usage, dont aussi bien le besoin ne se fait pas sentir avec le prototype de la variété où le pigment pyocyanique n'est pas apparent sur gélose-peptone glycinée. C'est ce même réactif, la glycérine en étant seule-

ment retranchée. Du coup, les deux germes montrent le mélange de jaune verdâtre et de rouge dans les vingt-quatre heures au plus, où succède le rougissement total au plus en quarante-huit heures. Telles sont les différences au regard de ces essais, des trois états du milieu peptoné, qu'il y aurait donc toujours avantage à essayer concurremment.

Le germe de Nancy est donc un représentant de la variété érythrogène, dont la fonction caractéristique est contre-balancée par la fonction pyocyanogène; et, pour si peu que ce soit, encore se différencie-t-il par là du germe que j'ai d'abord étudié, où cette dernière fonction est, au contraire, subordonnée à l'érythrogène à tel point que son produit n'affecte jamais la vue : le type normal de la variété étant ainsi constitué, répétons-le, par un germe de race A, c'est-à-dire capable, en fait, de pyocyanine dans le bouillon, qui ne donne, à la vue, sur gélose-peptone glycinée que jaune verdâtre et rouge, sans pyocyanine que décelable par le chloroforme.

DE LA VARIÉTÉ MÉLANOGÈNE

J'ai jadis émis l'hypothèse que le germe pyocyanique de cette variété a pu devoir au long séjour qu'il fit dans un organisme humain la nouvelle fonction chromogène qu'il nous a fait connaître. Ce serait le résultat de conditions qu'on dirait, à juste titre exceptionnelles, déjà d'après l'observation du cas (1) où il s'est produit, encore mieux s'il était avéré, d'autre part, que ce germe est toujours le seul représentant de la variété qu'il a servi à établir. Quoi qu'il en soit, nul autre germe semblable n'est venu en ma possession ni des nombreux correspondants à qui je me suis dès longtemps adressé, ni des circonstances de ces années dernières, pour fertiles qu'elles fussent en parasitisme pyocyanique des plaies de guerre.

Quelle place tient cette fonction mélanogène dans la biologie du bacille pyocyanique? S'est-elle, conformément à l'hypothèse susdite, ajoutée aux fonctions du germe normal, dont l'expression pigmentaire en milieux peptonés est, comme on

(1) Dr CASSIN, Observation d'un sujet chez qui fut trouvé le bacille pyocyanique mélanogène. Ces *Annales*, t. XVI, 1902, p. 327.

sait, pyocyanine et pigment rouge; ou, venue en concurrence, pour ainsi dire, dans l'association primitive des fonctions pyocyanogène et érythrogène, s'est-elle substituée à cette dernière pour donner la variante mélando-pyocyanique à la formule érythro-pyocyanique du rendement pigmentaire habituel dans ces milieux? La question n'est pas facile à résoudre. Je n'ai toujours à ma disposition, je répète, qu'un descendant du germe rencontré dans les conditions particulières que j'ai publiées. Il va même nous fournir, en passant, un bon exemple des variations qu'imprime aux fonctions microbiennes une série prolongée de cultures dans nos milieux de laboratoire.

C'est, à l'origine, le germe dont, pendant trois mois de culture en milieux artificiels divers, y compris le bouillon simple, M. Radais n'obtient, en dehors du pigment brun, que de la fluorescence verte sans trace de pyocyanine. La pyocyanine apparut au bout de ce temps en bouillon peptoné; mais la coloration brune finissait toujours par absorber les autres pigments dans le bouillon aussi bien que dans les autres milieux. Au contraire, l'échantillon provenant de la même origine, que j'étudiai un peu plus tard à l'Institut Pasteur de Lille, ne donnait plus le nouveau pigment qu'en peptone; en bouillon simple il ne se distinguait pas du bacille pyocyanique ordinaire, et ne faisait donc que pyocyanine et fluorescence verte, comme étant de race A. Actuellement, le germe de la même descendance, conservé dans les collections de l'Institut Pasteur de Paris et auquel je suis aujourd'hui réduit, ne donne plus en bouillon ni fluorescence ni pyocyanine, dégénéré en race S désormais. Sur gélose-peptonée glycinée du bleu reparait en revanche, empiétant sur le brun; et c'est proprement un type mixte à qui nous avons affaire, intermédiaire aux variétés M et Pe, comme s'est montré, dans la variété érythrogène, le germe de Nancy, intermédiaire à E et Pe.

Cette production de bleu prouve, ce qui ne faisait pas autrement besoin, que le milieu est conforme, et donc que nous y pourrions trouver du pigment rouge mélangé au bleu, s'il était dans les moyens du microbe. Seulement, après que la pyocyanine a été soustraite par le chloroforme, nous restons en présence d'une masse brune, où du rouge peut être mélangé, sans que, faute d'un dissolvant électif, comme est le chloro-

forme pour la pyocyanine, nous puissions faire le départ de l'un et l'autre pigment. D'en autre côté, comme nous l'avons déjà vu à propos de la variété érythrogène, nous constatons encore cette fois que la gélose-peptone sans glycérine assure la production, sans mélange de pyocyanine, du pigment inhérent à la variété. Mais cela ne facilite pas davantage la découverte du rouge qui pourrait y être mêlé. La solution de cette question doit donc être renvoyée à la rencontre éventuelle d'un germe où les pigments seraient différemment répartis, que nous sommes en droit d'attendre du hasard des circonstances extérieures, sinon de la sélection dans les cultures mêmes du germe dont nous disposons. De l'une ou de l'autre provenance nous pouvons tout de même présumer, sans souci exagéré de symétrie, simplement d'après ce que nous avons vu déjà, qu'un germe se trouve quelque jour, qui soit à la variété mélanogène ce qu'est au regard de l'érythrogène le bacille pyocyanique ordinaire, qui fournirait dès lors le type d'une nouvelle variété pyocyanogène, celle-ci à aboutissant mélanique sur gélose-peptone glycinée, de la même façon et par le même mécanisme que nous y voyons l'aboutissant rouge de l'unique variété pyocyanogène qui soit encore connue (1).

RÉSUMÉ

Nous connaissons actuellement quatre pigments produits par le bacille pyocyanique :

le pigment bleu (pyocyanine de Fordos) qui lui appartient en propre, nécessaire et suffisant pour authentifier l'espèce;

le pigment vert fluorescent, sans valeur diagnostique, étant produit par beaucoup d'autres espèces;

le pigment jaune verdâtre, à terme d'oxydation rouge;

le pigment rouge brun, mélanique; ces deux derniers pigments ne s'étant encore rencontrés que dans des cultures de germes pyocyaniques, mais insuffisants, à eux seuls, pour faire conclure à cette espèce.

(1) Pe étant attribué à la variété pyocyano-érythrique actuellement connue désignerait Pm pour la notation de la variété pyocyano-mélanique encore hypothétique.

Les rapports de ces pigments avec les milieux sont les suivants, les germes de la race A pris pour étalons et pour représenter, dans chaque variété, le type pigmentaire :

la pyocyanine et le vert fluorescent vont avec le bouillon, eu égard aux qualités actuelles des germes, sinon à la nature du bouillon que nous avons vu qui se prête aux quatre pigments;

la pyocyanine, les pigments rouge et rouge brun, avec les milieux peptonés.

L'isolement des pigments par la culture s'obtient :

pour le vert fluorescent, en ensemençant en bouillon un germe de race F, de quelque variété qu'il soit;

pour la pyocyanine, en ensemençant en eau peptonée, et encore mieux sur gélose-peptone glycinée, un germe de la variété Pe, à quelque race qu'il appartienne;

pour les pigments rouge et rouge brun, en ensemençant en milieu peptoné, liquide ou solide, la glycérine dûment exclue, des germes des variétés E et M.

Quant à la répartition des pigments entre les variétés :

le vert fluorescent appartient aux trois variétés, produit dans le bouillon par ensemencement de germes de leurs races A et F;

la pyocyanine, aux trois également, produite : dans le bouillon, par les germes de leurs races A et P; sur la gélose-peptone glycinée, par un germe quelconque des trois variétés qui y donnent en même temps leurs pigments caractéristiques respectifs;

le rouge brun, mélanique, appartient exclusivement à la variété mélanogène, M;

la pyocyanine et le pigment rouge prédominent respectivement dans les variétés pyocyanogène, Pe, et érythrogène, E, où ils coexistent en proportions inverses.

Les variétés étant ainsi toutes fondées sur des couples pigmentaires, on en aurait l'expression adéquate dans les formules binaires, avec le pigment principal en premier terme, correspondant, comme ci-après, aux dénominations en usage :

Pyocyano-érythrique à Pyocyanogène;

Erythro-pyocyanique à Erythrogène ;

Mélano-pyocyanique à Mélanogène ;

Pyocyano-mélanique se peut pressentir, dont le type ne s'est pas encore rencontré.

Pyocyanine et pigment vert fluorescent manifestés, comme on a vu, en bouillon, y donnent lieu, suivant l'alternative, aux races :

A, par l'association des deux pigments ;

P, par pyocyanine sans fluorescence ;

F, par fluorescence sans pyocyanine ;

S, par défaut de l'un et l'autre pigment ;

lesquelles races, reportées en milieu peptoné, ont toutes quatre la propriété d'y faire de la pyocyanine.

En résumé, de façon schématique, on peut dire : le bouillon révèle sûrement la race, éventuellement la variété et l'espèce ; la peptone, sûrement la variété, et le plus souvent l'espèce ; la peptone glycinée, sûrement l'espèce et aussi la variété.

L'individualité de tout germe pyocyanique avec les propriétés inhérentes peut être représentée par ses deux lettres initiales de race et de variété, celle-ci exprimée la première, comme dans les exemples suivants :

PeA, pour le germe de race A de la variété pyocyanogène Pe : correspond à pyocyanine en peptone, pyocyanine et vert fluorescent en bouillon ; c'est, dans la race-type, le type de l'espèce et de la variété pyocyaniques et, comme il a été le premier, encore le plus souvent rencontré des germes pyocyaniques ;

MA, EA, races-types des variétés M et E. types pigmentaires de ces variétés, d'après quoi elles ont été décrites ;

MS, germe de race S de la variété mélanogène, M : signifie rouge brun en peptone, ni pyocyanine ni fluorescence en bouillon ; c'est le terme où a été réduit, par dégradation progressive à travers les vicissitudes des reports et passages, le prototype de la variété, de race A lors de sa découverte. La pyocyanine, pour authentifier l'espèce, ne s'y peut reconnaître que par le traitement chloroformique de sa culture peptonée ;

EF, race F de la variété érythrogène, E : implique pigment rouge en peptone, fluorescence verte en bouillon; c'est la race en laquelle a dégénéré, sous mes yeux, le premier échantillon qui s'offrit à mon étude, alors de race A, comme il convenait pour établir le type pigmentaire de la nouvelle variété;

PeP, pyocyanogène de variété et de race, qui ne montre que du bleu tant dans le bouillon que dans la peptone, réserve faite du rouge au terme du vieillissement, que nous savons interpréter désormais : s'est rencontré assez souvent depuis que mes premières recherches en ont été favorisées et que je l'ai par la suite réalisé expérimentalement aux dépens de PeA. Relativement à ce pyocyanogène strict un fait est à noter, parce qu'il contraste avec les cas de dégénérescence pigmentaire rapportés ci-dessus et qu'il offre quelque intérêt pour la façon dont on peut concevoir l'évolution des fonctions chromogènes dans l'espèce pyocyanique (1) : c'est que ce germe, ainsi restreint par artifice à la seule fonction pyocyanogène en bouillon, s'est conservé avec cette propriété intacte depuis vingt-sept ans dans les collections de l'Institut Pasteur.

*
* *

D'autres milieux que le bouillon et la peptone sont propres aux réactions caractéristiques des divers germes pyocyaniques : ils pourraient servir à confirmer le diagnostic; ils vaudraient moins pour l'établir. Au surplus le diagnostic est acquis, pour l'espèce, pour la variété et pour la race, dès les cultures en bouillon et en peptone, et aussitôt que possible, si l'on y a fait les ensemencements simultanés, comme je conseille; en même temps que, par l'emploi séparé de la peptone et du bouillon est effectuée une première séparation des pigments pyocyaniques. Les autres milieux ne procureraient d'indication ni si nette ni si rapide; ils ne nous eussent pas offert de particularité nouvelle; j'en ai dit l'essentiel en temps voulu, où je n'avais rien à ajouter. A dessein d'ailleurs j'ai borné cet exposé aux moyens les plus simples, intentionnellement aussi réduits au moindre nombre, qui n'ont pas laissé de donner quelques

(1) Essai sur la biologie du bacille pyocyanique. Ces *Annales*, t. XVI, 1902, p. 313.

résultats et qui doivent permettre de les reproduire. Or c'est la séparation d'autres produits microbiens que les pigments qui, vraisemblablement, s'obtiendrait par des moyens analogues, et la biologie d'autres espèces microbiennes que l'espèce pyocyanique pourrait sans doute profiter également de l'application, pourvu qu'elle fût suivie, de techniques même aussi élémentaires.

RECHERCHES SUR LES ANTIGÈNES MÉNINGOCOCCIQUES ET GONOCOCCIQUES

par M. NICOLLE, C. JOUAN et E. DEBAINS.

Les méningocoques et les gonocoques se ressemblent, comme on le sait, quant à leur forme, à leurs dimensions et à leur absence de colorabilité par la méthode de Gram : ils sont vraiment indiscernables. Ils peuvent déterminer, chez l'homme, des manifestations identiques. Leur virulence, pour les animaux, nulle en ce qui concerne les gonocoques, se tient « à la limite » avec les méningocoques. Le gonocoque infecte aisément l'urètre humain, le méningocoque point (Zupnik). Le méningocoque *type* fait fermenter le maltose et le glucose, le gonocoque *type*, le glucose seul. Ajoutons, d'après nos recherches, que le méningocoque, isolé sur la gélose-sérum (formolé), se développe ensuite abondamment sur la gélose T, tandis que le gonocoque, isolé sur la gélose-ascite, pousse ensuite très bien sur la gélose-sérum (formolé), mais ne donne aucune culture sur la gélose T.

Quelles sont, maintenant, les ressemblances et les différences des deux espèces microbiennes, quant à leurs « caractères antigènes » ? Les phénomènes d'agglutination et de fixation (méthode Bordet-Gengou) vont nous les indiquer.

AGGLUTINATION

SÉRUMS ÉTUDIÉS. — Nous avons employé : un sérum antiméningococcique du type A (MA 1), un sérum du type B (MB 1), deux sérums du type C (MC 1, MC 2) et un sérum antigonococcique (G 1). D'autres sérums antigonococciques (G 2, G 3) se comportent, vis-à-vis des gonocoques, comme le sérum G 1 ; nous ne connaissons donc, actuellement, qu'un seul « type antigène », chez ce genre de bactéries.

Tous nos sérums, fournis par les chevaux, jouissent de propriétés thérapeutiques (y compris le sérum G 1). Les sérums MA 1, MB 1, MC 1 nous servent, en plus, de réactifs, pour l'identification des méningocoques.

(Inutile de faire remarquer que les sérums MA 1, MB 1... ont été obtenus avec les échantillons MA 1, MB 1...)

ÉCHANTILLONS ÉTUDIÉS. — Deux méningocoques du type A, deux du type B, deux du type C et 10 gonocoques (la plupart dus à l'obligeance de notre ami Demonchy).

TECHNIQUE SUIVIE. — On émulsionne les germes, dans la solution physiologique (NaCl 1 p. 100), à raison de 1 centigr. de microbes par 20 cent. cubes de cette solution. Il convient d'employer des cultures jeunes, sur gélose-sérum (formolé) pour les gonocoques et sur gélose T pour les méningocoques. La préparation des deux géloses se trouve indiquée dans un travail antérieur, consacré aux méningocoques (1).

Les émulsions ont été étudiées, comparativement, telles quelles et après traitement par l'acide chlorhydrique (méthode de Porges).

Méthode de Porges (modifiée par nous). — On ajoute, à 20 cent. cubes d'émulsion, 1/10 de centimètre cube d'HCl normal; on plonge 5 minutes dans l'eau bouillante; on refroidit sous un courant d'eau et on neutralise avec 1/10 de centimètre cube de NaOH normale.

Pour réaliser l'agglutination, on verse 1 cent. cube d'émulsion (telle quelle ou traitée par HCl) dans une série de tubes et on ajoute, respectivement : 1/20, 1/50... 1/100; 1/200... et même, au besoin, 1/1.000, 1/2.000 cent. cube de chaque sérum étudié. On agite quelques instants (après avoir bouché à la ouate), en inclinant et redressant les tubes alternativement, puis on lit. On abandonne ensuite les tubes pendant vingt-quatre heures (température ordinaire) et on fait une seconde lecture, laquelle donne parfois des valeurs légèrement supérieures aux premières, mais jamais de véritables surprises.

REMARQUE. — Le sérum équin normal s'est toujours montré inactif vis-à-vis des émulsions, naturelles ou modifiées.

(1) Ces *Annales*, avril 1918.

RÉSULTATS OBTENUS. — Ils sont consignés dans les tableaux I et II; en voici le résumé.

Émulsions telles quelles. — Les méningocoques de chaque type ne sont sensibles qu'au sérum homologue, comme nous l'avions déjà montré; le *sérum antigonococcique* ne les agglutine point; il *n'agit pas* davantage sur les *gonocoques*. Donc : *diagnostic facile*, pratiquement, entre les *méningocoques* et les *gonocoques*.

Émulsions traitées par HCl. — Les méningocoques, soumis à la méthode de Porges, perdent leur agglutinabilité par les sérums MA 1 et MB 1 (exception unique : le méningocoque MA 2, dont l'antigène A se montre exceptionnellement résistant). Par contre, ils deviennent *tous* sensibles au sérum antigonococcique.

Signification des lettres employées dans les tableaux.

Y. 1/20 cent. cube.	C. 1/500 cent. cube.
Z. 1/50 —	D. 1/1.000 —
A. 1/100 —	E. 1/2.000 —
B. 1/200 —	

TABLEAU I. — Pouvoir agglutinant des sérums sur les émulsions fraîches.

ÉCHANTILLONS	SÉRUMS				
	MA 1	MB 1	MC 1	MC 2	G 1
MA 1.	B	O	O	O	O
MA 2.	B	O	O	O	O
MB 1.	O	Z	O	O	O
MB 2.	O	B	O	O	O
MC 1.	O	O	B	Z	O
MC 2.	O	O	B	A	O
G 1, G 2, G 3, G 4, G 5, G 6, G 7, G 8, G 9, G 10.	O	O	O	O	O

Le sérum MC 1 les agglutine également tous. L'acide chlorhydrique « démasque » donc un antigène gonococcique chez

MA 1, MA 2, MB 1 et MB 2. Il le démasque aussi chez MC 1 et MC 2, car, s'il agissait d'une simple conservation de l'antigène méningococcique C, le sérum MC 2, actif sur MC 1 et MC 2 non modifiés, devrait encore les agglutiner après traitement chlorhydrique, ce qui n'a pas lieu.

Les gonocoques, soumis au procédé de Porges, deviennent

TABLEAU II. — Pouvoir agglutinant des sérums sur les émulsions traitées par HCl.

ÉCHANTILLONS	SÉRUMS				
	MA 1	MB 1	MC 1	MC 2	G 1
MA 1.	O	O	Z	O	Z
MA 2.	B	O	B	O	B
MB 1.	O	O	Z	O	A
MB 2.	O	O	A	O	B
MC 1.	O	O	Z	O	B
MC 2.	O	O	A	O	Z
G 1.	O	O	A	O	C
G 2.	O	O	A	O	A
G 3.	O	O	Z	O	B
G 4.	O	O	Z	O	C
G 5.	O	O	B	Y	D
G 6.	O	C	D	O	E
G 7.	O	O	A	O	E
G 8.	O	O	A	O	B
G 9.	O	Y	Z	O	B
G 10.	O	O	A	O	A

régulièrement agglutinables par les sérums G 1 et MC 1, éventuellement par le sérum MB 1, exceptionnellement par le sérum MC 2.

En utilisant, comme réactifs, les sérums MA 1, MB 1 et MC 2, il serait donc aisé de distinguer les méningocoques des gonocoques, puisque les premiers perdent, dans la règle, leur agglu-

tinabilité spécifique après traitement chlorhydrique, tandis que les seconds l'acquièrent.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS.

Les méningocoques, comme les gonocoques, contiennent tous l'antigène gonococcique (G 1); le méningocoque MC 1 le contient même assez abondamment, puisqu'il engendre une agglutinine du type G 1. Le méningocoque MB 1 contient un nouvel antigène, que nous appellerons, provisoirement, *antigène x*, afin de ne pas préjuger de sa signification et qui lui est commun avec certains gonocoques (G 6 et G 9). Pour établir l'autonomie de cet antigène, il faut démontrer que les effets du sérum MB 1 relèvent d'une *agglutinine x* et non de l'agglutinine G 1. S'il s'agissait de cette dernière, on devrait observer l'agglomération du gonocoque G 7, aussi sensible que le gonocoque G 6 au sérum G 1 et l'absence d'agglomération du gonocoque G 9, bien moins sensible. Or c'est l'inverse qui apparaît. Ajoutons que le méningocoque MC 2 ne contient guère plus d'antigène G 1 que les échantillons MA 1, MA 2, MB 1 et MB 2.

FIXATION

SÉRUMS ÉTUDIÉS. — Les mêmes que tout à l'heure.

ÉCHANTILLONS ÉTUDIÉS. — Les six méningocoques déjà mentionnés et les six premiers gonocoques.

TECHNIQUE SUIVIE. — Les émulsions sont bouillies pendant cinq minutes, puis refroidies. On en verse 1 cent. cube dans une série de tubes et on ajoute des quantités décroissantes de chaque sérum spécifique, à partir de 1/100 cent. cube. On fait deux témoins, avec du sérum équin normal (1/100 et 1/200 cent. cube), etc.; nous renvoyons, pour les détails, assez nombreux, au travail déjà cité.

RÉSULTATS OBTENUS. — Ils sont consignés dans le tableau III, dont voici le résumé.

Les méningocoques de chaque type fixent le complément,

soit exclusivement, soit d'une façon dominante, en présence du sérum homologue, comme nous l'avons indiqué ailleurs. Ils fixent, *tous*, le complément, en présence du sérum antigonococcique.

Les gonocoques fixent toujours le complément, en présence du sérum antigonococcique et, inconstamment, en présence des sérums MA 1, MB 1 et MC 1.

La réaction de Bordet-Gengou ne permet donc pas de reconnaître sans plus un méningocoque d'un gonocoque; le diagnostic précis (espèce; et type, pour le méningocoque) demeure aléatoire et exige des manipulations aussi délicates que compliquées, auxquelles il vaut mieux renoncer.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS.

Rappelons que, selon nous, les anticorps qui interviennent dans la réaction de Bordet-Gengou ne sont autres que les bactériolysines. Chaque antigène microbien détermine, habituellement, la production de lysines et d'agglutinines, également spécifiques.

TABLEAU III. — Pouvoir fixateur, en présence des sérums, des émulsions bouillies 5 minutes.

ÉCHANTILLONS	SÉRUMS			
	MA 1	MB 1	MC 1	G 1
MA 1.	D	B	A	A
MA 2.	C	A	O	A
MB 1.	B	E	O	A
MB 2.	B	C	A	B
MC 1.	B	A	C	A
MC 2.	B	A	B	A
G 1.	A	O	O	C
G 2.	O	A	A	B
G 3.	O	A	A	C
G 4.	A	O	O	B
G 5.	O	C	O	B
G 6.	O	D	A	C

Par l'agglutination et la fixation réunies, on peut donc réaliser l'« analyse antigène » d'un microbe, comme nous l'avons déjà montré.

Les méningocoques, comme les gonocoques, contiennent, tous, l'antigène gonococcique (G 1); le méningocoque MC 1 le contient moins abondamment que les gonocoques, puisque le sérum MC 1 n'agit pas régulièrement sur ceux-ci. Donc : aucune contradiction entre les résultats de l'agglutination et ceux de l'épreuve Bordet-Gengou. Le méningocoque MB 1 contient « toujours » l'*antigène x*, nouvelle concordance entre nos deux séries de recherches. Le méningocoque MA 1 montre un nouvel antigène, que nous appellerons, provisoirement, *antigène y* et qui lui est commun avec certains gonocoques (G 1 et G 4); la *lysine y* diffère incontestablement de la *lysine x*, puisqu'elle n'agit pas sur les mêmes germes (inutile de chercher d'autres preuves); l'*antigène y* engendre plus facilement une lysine qu'une agglutinine.

CONCLUSIONS

L'agglutination, pratiquée sur des émulsions non modifiées, permet de reconnaître aisément les méningocoques, toujours sensibles aux sérums antiméningococciques (et insensibles au sérum antigonococcique), des gonocoques, toujours insensibles au sérum antigonococcique (et, bien entendu, aux sérums antiméningococciques). [Rappelons que chaque type de méningocoque n'est aggloméré, habituellement, que par le sérum de même catégorie; lorsque d'autres sérums antiméningococciques agissent, éventuellement, sur lui, ils ne le font que sous un volume très supérieur].

La méthode de Porges, qui rend, dans la règle, les méningocoques insensibles vis-à-vis de leurs agglutinines spécifiques (A, B et C), confère, inversement, aux gonocoques une parfaite sensibilité vis-à-vis de l'agglutinine homologue. Différence importante entre les deux espèces microbiennes, si voisines sous bien des rapports. La restitution de l'agglutinabilité (1)

(1) M. NICOLLE, C. JOUAN et E. DEBAINS, *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 12 octobre 1918.

offre non seulement un haut intérêt théorique, mais encore des avantages pratiques immédiats : pour la séro-identification des gonocoques et, éventuellement, de leurs races ; pour le séro-diagnostic des infections gonococciques (comme nous avons pu nous en convaincre, dans un cas de salpingite).

La méthode de Porges rend également les méningocoques sensibles à l'agglutinine gonococcique, que contiennent le sérum antigonococcique et un sérum antiméningococcique du type C (sérum MC 1). Elle démontre, enfin, l'existence d'un antigène nouveau, commun au méningocoque MB 1 et à certains gonocoques.

La méthode Bordet-Gengou confirme les résultats fournis par l'agglutination, mais elle n'est d'aucun secours pour le diagnostic différentiel entre les méningocoques et les gonocoques. Elle met en évidence le nouvel antigène déjà signalé et un second, commun au méningocoque MA 1 et à certains gonocoques.

Les méningocoques et les gonocoques possèdent donc des antigènes communs, fait déjà signalé. Deux de ces antigènes (C 1 et x) n'ont été révélés, par la réaction agglutinante, que chez les gonocoques soumis au procédé de Porges (le sérum de chevaux immunisés étant pris comme réactif). Il semble donc que les antigènes, contenus dans les gonocoques, offrent un « état physique » particulier, qui oblige à les démasquer lors de l'agglutination. Cet état est-il constant ? La suite de nos recherches le montrera. Nous avons trouvé que certains pneumocoques des types I et III et un grand nombre de pneumocoques du type II (1) ne s'agglutinent qu'après traitement chlorhydrique. Ici l'« état physique » de l'antigène varie selon les échantillons, les autres caractères du microbe demeurant les mêmes ou variant indépendamment.

Existe-t-il des gonocoques d'un type différent de celui que nous avons observé jusqu'ici (type G 1, si l'on veut) ? Cela est fort probable et il ne faudrait pas s'étonner de rencontrer des échantillons où dominent les antigènes x ou y .

(1) Nous adoptons, provisoirement, la classification des auteurs américains, sur laquelle nous présenterons, plus tard, certaines remarques.

ESSAIS DE SÉROTHÉRAPIE D'UNE AFFECTION MYCOSIQUE CHRONIQUE

(LYMPHANGITE ÉPIZOOTIQUE DES SOLIPÈDES)

par L. NÈGRE et A. BOQUET

Institut Pasteur d'Algérie et Centre militaire de recherches (Ecole d'Alfort).

Au cours de l'année 1917, nous avons fait quelques essais thérapeutiques, malheureusement interrompus, avec un sérum antilevure provenant d'un mouton traité par des injections de doses croissantes de cultures de levures non pathogènes (*Saccharomyces ellipsoïdeus*).

Des résultats intéressants furent observés. Toutefois, phénomène spécifique ou accident sérique, un des chevaux traités par des injections de fortes doses (40 à 80 cent. cubes) de ce sérum, répétées tous les deux ou trois jours, devint, en une semaine, cachectique à tel point, après avoir présenté une amélioration de ses lésions, qu'il dut être dirigé sur un clos d'équarrissage.

Latour (1) a exposé récemment les bons résultats qu'il a obtenus en traitant un certain nombre d'animaux cryptococciques par du sérum de cheval guéri. Il assure que le nombre des succès dépasse 75 p. 100 et il préconise les doses massives, 150 cent. cubes tous les quatre ou cinq jours en injections sous-cutanées.

Les essais d'un sérum anticryptococcique que nous exposons dans la suite ne confirment pas toutes les conclusions de cet expérimentateur. Le labeur de plusieurs années ne nous a pas encore fait connaître le remède héroïque de la lymphangite épizootique, dont la découverte fut si souvent annoncée. Le résultat de nos études est beaucoup plus modeste. Nous con-

(1) LATOUR, Traitement de la lymphangite épizootique par le sérum de cheval guéri. Communication à l'Académie de Médecine, 30 juillet 1918.

naissions mieux le cryptocoque de Rivolta, grâce aux cultures que nous avons pu réaliser. Nous avons guéri par la mycothérapie une proportion satisfaisante de chevaux gravement atteints et les expériences en cours nous permettent d'entrevoir un procédé d'immunisation efficace. Mais nous n'avons aucune prétention à l'absolu.

L'objet de cette étude est de présenter l'observation d'un cas particulièrement intéressant dont la portée théorique peut dépasser le champ de la lymphangite épizootique.

*
* *

I. — Pouvant disposer à notre gré de grandes quantités de cultures de cryptocoques, il nous était facile de tenter l'hyperimmunisation d'un cheval et de préparer un sérum spécifique.

Dans ce but, nous nous sommes inspirés de la technique générale indiquée par M. Borrel (1) et appliquée avec le plus grand succès dans la préparation du sérum anticlavéleux.

Un cheval guéri de lymphangite ulcéreuse, mais n'ayant jamais présenté aucune lésion cryptococcique, fut traité par des injections sous-cutanées de cultures de cryptocoques, ainsi qu'il suit :

1 ^{er} jour, 0 gr. 05 de cultures surgélose, âgées d'un mois, broyées, stérilisées par chauffage et émulsionnées dans 5 c. c. d'eau physiologique.		
13 ^e jour, 0 gr. 07	—	7 c. c.
20 ^e jour, 0 gr. 20	—	20 c. c.
32 ^e jour, 0 gr. 18 de cultures vivantes de même âge, broyées et émulsionnées dans 18 c. c.		—
44 ^e jour, 0 gr. 40	—	40 c. c.
56 ^e jour, 1 gr. 20	—	60 c. c.
68 ^e jour, 3 gr. 10	—	60 c. c.
81 ^e jour, 3 gr. 50	—	60 c. c.
93 ^e jour, 3 gr. 50	—	60 c. c.
103 ^e jour, 4 gr.	—	60 c. c.
118 ^e jour, 4 gr.	—	60 c. c.

Le cheval fut saigné quinze jours après la dernière injection.

Les inoculations provoquèrent de volumineux œdèmes et des

(1) A. BORREL, Etudes sur la clavelée. Ces *Annales*, t. XVII, 1903.

abcès qui s'ouvrirent du 6^e au 10^e jour et se cicatrisèrent en quelques jours, après avoir suppuré abondamment.

Toutes furent suivies d'une réaction thermique qui atteint 3^e après les doses de 3 à 4 grammes. L'hyperthermie débutait quelques heures après les injections et persistait jusqu'à la fin du 3^e jour. Pendant toute la durée de la fièvre, l'état général restait défectueux : l'animal était triste, abattu, sans forces, l'appétit nul.

Bien que les anciennes lésions de lymphangite ulcéreuse fussent complètement cicatrisées, on observait, à leur niveau, 24 à 48 heures après l'inoculation, des phénomènes d'hyper-sensibilité qui disparaissaient très rapidement.

Vers le 80^e jour l'animal fut atteint d'une affection suppurée du pied, dont la cause n'avait aucune relation avec le traitement institué. A aucun moment le pus ne contient de cryptocoques, mais des accidents d'un caractère particulier se manifestèrent au cours des inoculations qui suivirent. Après chacune d'elles pratiquées dans la région de l'encolure, le cheval boitait très fortement et une corde lymphatique sensible, de la grosseur du doigt, s'étendait de la lésion du pied jusque sur l'avant-bras. Ces symptômes duraient deux ou trois jours, puis tout rentrait dans l'ordre.

La plaie se cicatrisa vers le 100^e jour et rien ne fut plus observé par la suite.

*
* *

III. — Des injections sous-cutanées de doses élevées (25 à 40 cent. cubes) de sérum anticryptococcique ainsi obtenu, pratiquées à des intervalles de 24-48 heures, sur des animaux atteints de lymphangite épizootique, provoquent, dans les premiers jours du traitement, une amélioration de courte durée, suivie d'une aggravation nette, qui se traduit par l'apparition de nouveaux ulcères et une augmentation de la suppuration.

Le sérum agit en favorisant la fonte rapide des nodules et détermine, au même titre que l'antigène correspondant, une vive réaction inflammatoire au niveau des lésions (réaction focale). Cependant, il est impuissant à arrêter l'infection qui continue à progresser.

Trois chevaux, très gravement atteints, ont été traités. L'un

d'eux mourut au cours du traitement. L'état des deux autres continua à s'aggraver et les injections furent suspendues.

*
* *

IV. — Le mode d'action du sérum se rapprochant de celui de l'antigène, le traitement fut modifié sur les deux chevaux restant. De faibles doses croissantes, comme dans la mycothérapie, furent substituées aux fortes doses employées et la voie endoveineuse remplaça la voie sous-cutanée.

Un des deux animaux traités, malade depuis plusieurs mois, présentait des lésions spécifiques très étendues sous la forme de vastes ulcères qui dénudaient totalement le membre postérieur droit et des symptômes d'intoxication générale par infection secondaire des plaies. Il fut sacrifié à l'agonie, après trois semaines d'essais négatifs.

Le cheval n° 3, malade depuis près de dix mois, était atteint de lymphangite épizootique généralisée et en voie de continue extension : larges ulcères sur les régions des côtes, des épaules, de l'encolure, de la face et de la gorge, de la muqueuse nasale et de la conjonctive. Cordes lymphatiques volumineuses au niveau de l'encolure, du poitrail et du membre postérieur droit. État général mauvais. Tous les traitements institués jusqu'ici avaient échoué et l'animal, jugé incurable, devait être prochainement abattu.

Les injections endoveineuses furent pratiquées de la manière suivante :

1 ^{er} jour. . .	4 c. c.	15 ^e jour. . .	12 c. c.
2 ^e jour. . .	2 c. c.	25 ^e jour. . .	12 c. c.
4 ^e jour. . .	5 c. c.	32 ^e jour. . .	15 c. c.
8 ^e jour. . .	10 c. c.		

Dans les premières vingt-quatre heures la suppuration augmenta et de nouveaux boutons apparurent qui devinrent fluctuants après quarante-huit heures et s'ouvrirent. Dès le 3^e jour, les masses indurées, du volume du poing, situées sur la côte et l'encolure et les cordes commencèrent à se résorber. Les cryptocoques disparurent peu à peu du pus et la cicatrisation des ulcères, vieux de plusieurs mois, s'effectua avec une rapidité vraiment surprenante.

Six semaines après le début du traitement, l'état général est excellent, la suppuration presque nulle; les petits ulcères (1 à 2 centimètres de diamètre) sont cicatrisés et les grands foyers bourgeonnants, larges comme la main, présentent une surface nette, en voie d'épidermisation.

Quels que furent les nombreux traitements que nous ayons tentés ou vu essayer, nous n'avons jamais observé de résultats aussi encourageants.

*
* *

V. — Les réactions focales d'origine sérique ont déjà été signalées par Laverde et Carrasquilla dans la lèpre traitée par des injections de sérum spécifique qui déterminaient « l'ulcération rapide du nodule lépreux et parfois sa guérison ». Mais ce furent Metchnikoff et Besredka qui analysèrent le phénomène et démontrèrent sa généralité en traitant des lépreux par des injections de doses croissantes de sérum hémotoxique. « L'amélioration qu'on obtient chez des lépreux avec des sérums est due non à des produits du bacille de Hansen, mais bien aux cytotoxines que renferment ces sérums... Des leucotoxines apparaissent dans ces sérums à la suite d'injections de sang ou de tissus humains.... Injectées à dose convenable, elles produisent une excitation du système phagocytaire plus active vis-à-vis du bacille lépreux, qui se traduit par une suppuration et une élimination abondante de ces microbes (1). »

*
* *

VI. — C'est dans le même ordre d'idées qu'il faut rechercher, croyons-nous, le mode d'action du sérum que nous avons expérimenté.

L'inoculation sous-cutanée de doses croissantes (0 gr. 05 à 4 grammes), à un cheval, de cultures de cryptocoques stérilisées puis vivantes, confère à son sérum, après quatre mois d'un tel traitement, des propriétés nouvelles.

L'injection de doses massives de ce sérum anticryptococcique

(1) METCHNIKOFF et BESREDKA, Recherches sur l'action de l'hémotoxine sur l'homme. Ces *Annales*, t. XIV, 1900.

à un malade provoque, dans son organisme, une réaction leucocytaire fugace, brutale, qui se manifeste par la fonte des lésions nodulaires et une abondante suppuration. Mais, comme au cours de la mycothérapie, cette dose excessive dépasse le but, favorise la pullulation des cryptocoques et aggrave l'infection.

Les injections endoveineuses, à doses faibles et croissantes du même sérum, pratiquées à des intervalles convenables, influencent non seulement la phagocytose, mais encore stimulent la digestion intracellulaire des parasites englobés et créent progressivement dans les foyers un milieu défavorable à leur multiplication.

*
* *

Les phénomènes décrits par Laverde et Carrasquilla, Metchnikoff et Besredka, dans la lèpre, et ceux que nous venons d'exposer, se reproduisent, à des degrés et sous les modes divers de réaction focale et générale, au cours de la sérothérapie antituberculeuse. Il n'est pas impossible qu'une technique, rigoureusement basée sur la pathogénie des accidents constatés sur les tuberculeux soumis au traitement sérique, vienne atténuer le redoutable pronostic de cette affection.

Nous adressons à M. l'Inspecteur général Leclainche et à M. le Vétérinaire Inspecteur Fray, à MM. les Professeurs Vallée et Sendrail, qui ont mis à notre disposition les matériaux d'études et les sujets d'expérience, l'expression de notre affectueuse gratitude pour la bienveillance qu'ils nous ont témoignée.

LE NUOC-MAM, CONDIMENT NATIONAL INDOCHINOIS

par EDMOND ROSÉ,

Docteur ès Sciences, Chef de laboratoire à l'Institut Pasteur,
Directeur du Laboratoire officiel pour la répression des fraudes
en Cochinchine.

Un certain nombre de travailleurs annamites sont employés en France dans les arsenaux : le Gouvernement de l'Indochine, voulant témoigner de l'intérêt qu'il prend à ses administrés éloignés du sol natal, a jugé qu'il serait bon de leur adresser une certaine quantité des denrées préférées qui entrent dans leur alimentation.

Ces denrées sont connues : le Poisson salé et le Riz sont les principales avec la seiche et les crevettes séchées ; il faut encore y ajouter une denrée d'un autre ordre, l'agar-agar, communément désigné en Indochine sous le nom de Vermicelle annamite et qui se mange sous forme de soupe.

L'ordonnancement du repas annamite diffère notablement de celui du repas européen. Ce qui caractérise le repas annamite, même ordinaire, c'est la multiplicité des plats, chacun à vrai dire peu copieux. Tous les mets et condiments sont servis à la fois sur la table : le pain est remplacé par le riz cuit à l'eau servi en abondance. Ce riz est mangé à l'aide de baguettes par bols successifs en même temps qu'au gré de sa fantaisie, l'Annamite pique dans les divers mets préparés et servis près de lui et ajoute le mets piqué au bol de riz qu'il avale. Un Annamite adulte mange cinq à six bols de riz accompagnés chacun de viande, poisson ou légumes diversement combinés et faisant en somme cinq ou six plats différents.

Le tout est arrosé d'un condiment national qui est le Nuoc-mam.

C'est au sujet de ce condiment national peu connu en France, au moins dans sa fabrication et sa composition chimique, que quelques précisions paraissent nécessaires.

I. — PRÉPARATION.

Nuoc-mam en annamite veut dire « Eau de poisson salé » ; le Nuoc-mam est, en effet, obtenu à partir du poisson, du sel et de l'eau ; voici un résumé de sa fabrication telle qu'elle est pratiquée en Annam dans un centre important.

On utilise pour le Nuoc-mam plusieurs espèces de poissons, dont certaines appartiennent à la famille des Clupéidés, ces poissons passent par bancs le long des côtes à des époques déterminées.

Le poisson pêché est placé aussitôt avec du sel dans des cuves en bois de grandeur et de forme variables. On y fait alterner poisson et sel jusqu'au remplissage et au delà ; on laisse trois jours en contact dans la cuve remplie, puis on recueille par un robinet placé à la partie inférieure tout le liquide salin qui peut s'écouler. On soumet ensuite la masse de poisson débarrassée de son eau à une forte pression et on reverse sur cette masse, dans la cuve, le liquide précédemment recueilli. On laisse alors en macération pendant une durée qui varie beaucoup suivant les espèces de poissons employées.

Pendant ce temps une transformation de la chair du poisson s'opère et à un moment donné, déterminé par la pratique, on recueille un Nuoc-mam de toute première qualité. Ce Nuoc-mam n'est généralement pas commercial.

Les qualités 2^e et 3^e sont obtenues par des lessivages du poisson résiduaire avec l'eau de mer additionnée de sel. Ces lessivages ne fournissent du Nuoc-mam de qualité 2^e et 3^e, qui sont les qualités commerciales, que jusqu'à un point empiriquement fixé ; on les poursuit cependant jusqu'à épuisement du poisson, mais alors le liquide recueilli doit, pour constituer du Nuoc-mam, être repassé sur d'autres cuves renfermant du poisson neuf ou non complètement épuisé.

On voit d'après ce résumé de la fabrication que le Nuoc-mam n'est autre chose que le résultat de la macération du poisson dans une solution concentrée de sel marin.

II. — COMPOSITION CHIMIQUE.

Que se produit-il pendant cette macération?

Un essai qualitatif montre que le Nuoc-mam renferme des traces d'albumine, pas de protéoses mais des peptones, que le liquide est neutre au tournesol, acide à la phthaléine, alcalin à l'orangé et donne à l'eau de brome la réaction du tryptophane. Le dosage des matières azotées est particulièrement instructif.

Nous avons dans un Nuoc-mam de 1^{re} qualité de l'Annam et pour 1 litre :

	Grammes
Azote total	23
— organique	19,1
— titrable au formol	14,5
— ammoniacal et amidé (dégageable par MgO).	4,0
— des acides aminés	10,5

En rapportant à 100 parties d'azote total les proportions des différents éléments azotés on a :

Azote organique	83	p. 100 d'azote total.
— titrable au formol	63	— —
— ammoniacal	17	— —
— des acides aminés	46	— —

Ces résultats nous montrent qu'avec le Nuoc-mam nous sommes en présence de produits de la dégradation des matières albuminoïdes. Si nous rappelons que l'analyse des produits d'une digestion pepsique d'ovalbumine montre que cette digestion peut donner, en azote titrable au formol, 26,5 p. 100 de l'azote total dissous (1) tandis que dans une digestion pancréatique on obtient, en azote titrable au formol, jusqu'à 60,2 p. 100 de l'azote total, si nous ajoutons la neutralité du milieu, la présence de tryptophane, on conclura que le Nuoc-mam se rapproche des produits de la digestion trypsique des albuminoïdes; le Nuoc-mam serait surtout une solution de peptone pancréatique de poisson.

Cette « peptone de poisson » serait le résultat d'une auto-

(1) *Les catalyseurs biochimiques dans la vie et dans l'industrie*, par Jean EFFRONT, 1914.

digestion de la chair des différentes espèces de poissons employées, auto-digestion très probablement effectuée soit par les ferments de l'appareil digestif; soit simplement par les sucs cellulaires; la présence d'une forte dose de sel combat la pullulation microbienne et évite la putréfaction qui en serait la conséquence.

III. — VRAI ET FAUX NUOC-MAM. DIFFÉRENCIATION.

La préparation du Nuoc-mam, ainsi qu'on a pu en juger par le résumé que nous avons donné, est très simple; il y a peu de règles à suivre, mais ces règles, surtout en ce qui concerne les proportions minima de sel employées relativement à la quantité de poisson à traiter, sont impératives. Il faut employer au moins une partie de sel pour trois parties de poisson.

Si l'on sale moins, on obtient un produit qui résulte d'un travail différent de celui qui donne naissance au Nuoc-mam; ce n'est pas alors à vrai dire du Nuoc-mam, c'est un produit au moins inconsommable en raison de son odeur répugnante, sinon dangereux par les produits toxiques de la désintégration des acides aminés qu'il peut renfermer.

Voici la composition chimique qui rend compte du travail dont résulte un de ces produits obtenus en mélangeant au poisson une quantité insuffisante de sel; je la rapproche de celle d'un Nuoc-mam normal préparé en même temps.

Pour 100 d'azote total passé en dissolution on trouve :

	NUOC-MAM			
	normalement salé		insuffisamment salé	
Azote organique.	86,4	p. 100 de l'azote total.	63,7	p. 100 de l'azote total.
— titrable au formol	60,1	—	69,0	—
— ammoniacal.	13,6	—	36,3	—
— aminé	46,5	—	32,7	—

Ce qui différencie les deux produits, c'est que dans l'un — produit normal — la proportion des acides aminés est très supérieure à celle de l'ammoniaque; dans l'autre, au contraire, l'azote ammoniacal est plus élevé que l'azote des acides aminés.

(Dans le Nuoc-mam insuffisamment salé, envahi par une flore microbienne abondante, les acides aminés — produits

essentiels qui donnent au Nuoc-mam sa valeur alimentaire — ont été en partie détruits et de l'ammoniaque s'est formée à leurs dépens.

Le Nuoc-mam n'est donc pas une « Sauce de poisson pourri » comme cela se dit assez couramment, c'est au contraire une sauce de poisson pour laquelle on s'est attaché à combattre toute putréfaction.

Un Nuoc-mam donné sera d'autant meilleur que dans sa fabrication la putréfaction aura été le plus complètement évitée : le signe que cette putréfaction a été évitée paraît être un taux des acides aminés élevé pour le taux le plus faible possible de l'azote ammoniacal.

L'examen de nombreux échantillons de valeur marchande différente récoltés par nous-même dans les nombreuses saumuries que nous avons visitées a montré que toujours le taux de l'ammoniaque s'élève pendant que le taux des acides aminés s'abaisse lorsque la valeur marchande, c'est-à-dire la qualité, diminue. Les proportions d'azote des acides aminés et d'azote ammoniacal constituent, avec la détermination de l'azote total, le critérium auquel on reconnaît un bon ou un mauvais Nuoc-mam.

Or il était nécessaire que ce critérium soit recherché et fixé. En effet, l'industrie du Nuoc-mam donne lieu à un trafic important : c'est par milliers que les petites jarres en poterie grossière d'une contenance de 6 à 7 litres, coiffées d'un couvercle luté au mortier et assujetti par un rotin, sont chargées sur les jonques qui vont sillonner les nombreuses voies fluviales de la Cochinchine et porter aux riverains le produit si désiré.

Tout comme en France sur d'autres produits, la fraude s'est exercée en Cochinchine sur le Nuoc-mam.

La fraude la plus commune est le mouillage : elle se reconnaît en premier lieu au taux déficitaire de l'azote total. Mais aussi, le mouillage amène un abaissement du taux du sel. Or, si nous avons vu qu'un taux de sel déterminé est nécessaire à la production du travail qui aboutit au Nuoc-mam, un taux de sel déterminé dans le Nuoc-mam est nécessaire à sa conservation. Dans les Nuoc-mam mouillés et dont par conséquent le taux du sel est affaibli, l'action microbienne arrêtée reprend

son cours : le Nuoc-mam « tourne », comme disent les indigènes, mais bien avant que le Nuoc-mam ait tourné et soit rendu inconsommable par son odeur putride, l'analyse décèle que les acides aminés ont été en partie détruits ; que leur taux est devenu inférieur à celui de l'ammoniaque.

Déjà, à ce moment, on peut dire que le produit considéré ne se conservera pas, qu'il sera un jour ou l'autre inconsommable, que ce n'est plus du Nuoc-mam.

Le Nuoc-mam normal suffisamment salé garde au contraire sa composition initiale sensiblement fixe pendant un temps très long, une année certainement, probablement davantage encore. Des expériences en cours nous fixeront à ce sujet.

IV. — DÉFINITION DU NUOC-MAM.

Quoi qu'il en soit, un ensemble de faits recueillis et de résultats expérimentaux conduisent, dès maintenant, à une définition du Nuoc-mam.

Je la donne comme conclusion de ces notes et seulement comme provisoire ; mais, telle qu'elle est, par l'énoncé des caractères qu'elle renferme, elle suffit cependant à identifier le produit qui nous occupe.

Voici cette définition :

« Le Nuoc-mam est le résultat de la macération du poisson dans une solution concentrée de sel marin, c'est essentiellement une dissolution salée de matières albuminoïdes à un certain degré de désintégration. Ce degré doit se maintenir sensiblement fixe pendant un certain temps. Il est garant de l'état de conservation du Nuoc-mam.

« La richesse en azote total ou mieux en azote organique rend compte de la valeur alimentaire d'un Nuoc-mam et par conséquent de la qualité. Il y a généralement, selon les qualités commerciales, de 15 à 25 grammes d'azote total et de 10 à 20 grammes d'azote organique par litre.

« Le degré de désintégration des matières albuminoïdes passées dans le Nuoc-mam peut être établi de la manière suivante :

« Par rapport à l'azote total, le Nuoc-mam doit contenir de

60 à 77 p. 100 d'azote titrable au formol, la moitié au plus de l'azote titrable au formol peut être transformée en azote ammoniacal.

« Le temps minimum de conservation du Nuoc-mam peut être fixé à une année, intervalle qui sépare deux campagnes successives de pêche et de fabrication.

« Le taux du sel nécessaire pour assurer la conservation du Nuoc-mam et la fixité du degré de désintégration ne doit pas être inférieur à 200 grammes par litre pour les Nuoc-mam des premières qualités. Ce taux du sel nécessaire est plus élevé pour les Nuoc-mam de qualité inférieure ayant moins de 45 grammes d'azote total par litre; le taux du sel ne doit pas être pour ces derniers Nuoc-mam inférieur à 240 grammes par litre. »

On fait état dans cette définition :

1° Des procédés de fabrication du Nuoc-mam;

2° De l'azote total, qui représente la quantité de chair de poisson solubilisée, passée et contenue dans un Nuoc-mam;

3° De l'azote titrable au formol, qui indique la quantité de chair de poisson solubilisée sous la forme d'acides aminés et d'ammoniaque;

4° De l'azote des acides aminés, qui indique la quantité de ces produits qui relèvent de la digestion parfaite;

5° De l'azote ammoniacal, qui indique le déchet de la préparation et la part qui revient surtout à l'action microbienne; lorsque cette dernière part est prépondérante, l'action putride s'est donné libre cours et a pu introduire les produits toxiques auxquels elle donne ordinairement naissance;

6° Du taux du sel qui est nécessaire non seulement à l'obtention, mais encore à la conservation du Nuoc-mam.

Saïgon, le 12 janvier 1916.

CONDIMENTS AZOTÉS SOLIDES EN INDOCHINE

par

H. BRÉMOND

Pharmacien de 1^{re} classe
de la Marine.

ET

E. ROSÉ

Docteur ès sciences, Chef de Laboratoire à l'Institut Pasteur, Directeur du Laboratoire officiel pour la répression des fraudes en Cochinchine.

(Travail du Laboratoire de Chimie de l'Institut Pasteur de Saïgon.)

En dehors du Nuoc-mam (voir le mémoire précédent), qui parmi les populations annamites est le condiment le plus recherché et le plus répandu, il existe en Indochine des produits à l'aide desquels les indigènes corsent leurs aliments ainsi qu'ils le font le plus généralement avec le Nuoc-mam.

Ces produits sont bien connus et bien moins répandus; dans certaines contrées, on les trouve avec le Nuoc-mam qu'ils suppléent en partie, tel le Mam-Tôm en Cochinchine et en Annam; ou bien le Nuoc-mam ne se trouve pas dans la contrée, et ils suppléent complètement à ce produit dans l'alimentation indigène, tels le Prâhoc au Cambodge et le Padec au Laos.

Nous examinerons successivement la préparation et la composition chimique de ces trois condiments, Mam-Tôm, Prâhoc et Padec qui, à l'inverse du Nuoc-mam liquide, sont de consistance pâteuse et que nous avons pour cela réunis sous le titre de condiments azotés solides.

I. — MAM-TOM OU PÂTE DE CREVETTES

La préparation de ce condiment se rapproche des préparations du Nuoc-mam et du Mam ou poisson résiduaire.

Voici une des manières d'opérer pour préparer un bon Mam-Tôm :

On place dans une grande jarre ou dans une petite cuve et

on tasse à la main un mélange de 12 parties de crevettes pour 1 partie de sel. On laisse ainsi vingt-quatre heures en contact, puis on reprend les crevettes et on les presse pour en exprimer le suc. Le liquide ainsi recueilli est mis de côté pendant que, par ailleurs, on expose au soleil les crevettes pour les sécher, sans arriver cependant à ce qu'elles durcissent. On pile ensuite les crevettes séchées et on forme une pâte aussi fine que possible: plus la pâte obtenue est fine, meilleure est la qualité du produit. Cette pâte est replacée dans la jarre ou petite cuve utilisée au début, et on ajoute du jus précédemment obtenu et mis de côté jusqu'à ce que la jarre ou la cuve soit remplie à moitié. Quelquefois on cuit le jus avant de l'ajouter à la pâte. On remue avec un bâton la pâte et le jus de façon à obtenir un mélange homogène et on expose au soleil pendant quinze jours ou plus longtemps. La préparation est terminée en un mois, mais la pâte ainsi obtenue se conserverait indéfiniment; elle s'améliorerait avec le temps et plus ancienne elle est, plus cher elle est vendue. Un Mam-Tôm de quatre mois est vendu 5 \$ la touque.

La composition chimique du Mam-tôm est donnée par l'analyse suivante :

ANALYSE DE MAM-TOM

CARACTÈRES ORGANOLEPTIQUES.

Aspect	Pâte grumeleuse.
Couleur	Brunâtre.
Odeur	<i>Sui generis.</i>

ANALYSE CHIMIQUE.

	MAM-TÔM TOTAL pour 1.000	PARTIE SOLUBLE pour 1.000	PARTIE INSOLUBLE (par différence) pour 1.000
Réaction	Alcaline à la phtaléine.	»	»
Humidité	647,2	»	»
Extrait sec	352,8	276	76,8
Extrait dessalé	172,8	26	76,8
Cendres	219	180	39
Chlorures	180	180	»

	MAM-TÔM TOTAL pour 1.000	PARTIE SOLUBLE pour 1.000	PARTIE INSOLUBLE (par différence) pour 1.000
<i>Éléments azotés constitutifs.</i>			
Azote total	22,8	20,6	2,2
— organique	»	14,2	»
— titrable au formol.	»	12,4	»
— ammoniacal.	»	6,4	»
— aminé.	»	6	»
<i>Répartition de la matière azotée dans la partie soluble du Mam-Tôm.</i>			
Azote total.	100	Azote ammoniacal.	31,4
— organique.	68,9	— aminé	29,1
— formol.	60,2		

EXAMEN MICROSCOPIQUE.

Coccus peu nombreux.

L'analyse ci-dessus montre qu'il faut distinguer dans le Mam-Tôm une partie soluble dans l'eau et une partie insoluble.

La partie soluble dans l'eau est constituée par la chair de crevette transformée et solubilisée et par les sels minéraux solubles. Ceux-ci sont à peu près exclusivement composés de chlorures, représentant le sel mélangé aux crevettes. La partie insoluble est formée de la chair de crevette non transformée et de sels terreux. Elle représente environ 5 p. 100 du Mam-Tôm. Il y a environ 30 p. 100 de matière soluble et 65 p. 100 d'eau.

Si l'on examine la composition de la partie soluble on voit qu'elle contient pour un kilogramme de Mam-Tôm 20 gr. 6 d'azote total représentant 128 gr. 8 de matière azotée nutritive. C'est ce que renferme en matière azotée un Nuoc-mam de première qualité. D'autre part, la répartition de la matière azotée en azote ammoniacal et azote aminé est très voisine de celle du Nuoc-mam, avec cette différence que dans le Mam-Tôm analysé il y a un léger excès d'ammoniaque.

Le Mam-Tôm n'est donc autre chose qu'un Nuoc-mam pâteux, d'une fermentation ou digestion un peu poussée. Cependant, contrairement à ce qu'on pouvait supposer, la flore microbienne dans le Mam-Tôm est peu abondante. Un salage convenable

empêcherait la putréfaction et l'on obtiendrait ainsi une sorte de pâte analogue à la pâte d'anchois et assurément très comestible.

II. — PRAHOC

Le Prâhoc s'éloigne quelque peu du Mam-Tôm ; c'est, comme le Mam-Tôm, un condiment pâteux, mais sa préparation est assez différente et utilise le poisson au lieu de la crevette ; sa consommation est exclusivement limitée au Cambodge et au Siam.

De nombreuses espèces de poissons et de toutes tailles entrent dans la préparation du Prâhoc, dont on distingue deux qualités : l'une, la plus prisée, serait faite avec les espèces de poisson d'assez grande taille, la deuxième avec le petit poisson.

PRAHOC DE 1^{re} QUALITÉ. — D'après M. Pétillet (1), le Cambodgien emploie le plus souvent pour sa préparation le Trey (2) Pra, famille des Siluridés ; le Trey Ras (Ophicéphalidés) ; le Trey Pruôl (Cyprinidés) et le Trey Andong (Cobitidés).

Avec le Trey Andong seul, les Cambodgiens préparent un Prâhoc uniquement destiné à la consommation siamoise tandis qu'avec les autres poissons ils produisent un condiment dont le prix de revient, assez élevé, le fait destiner aux approvisionnements familiaux ainsi qu'aux tables des riches et moyennes classes. La fabrication du Prâhoc subit bien quelques variantes ainsi que l'a constaté l'un de nous dans un voyage d'études sur le Tonlé-Sap ; nous donnons ici d'après le D^r Ménaut, médecin de l'Assistance en service au Cambodge, le procédé de fabrication qui correspond à l'échantillon adressé dont nous donnons plus loin l'analyse. Le D^r Ménaut nous a adressé aussi un échantillon de Padec et nous le remercions ici de son obligeance.

Pour la fabrication du Prâhoc les poissons choisis sont écaillés, vidés, nettoyés, divisés en fragments assez gros ; les têtes sont rejetées.

On fait macérer les morceaux dans l'eau durant une nuit

(1) L. PÉTILLET, La pêche et les poissons au Cambodge.

(2) Trey, Poisson en cambodgien.

sans séparer les foies adhérents aux fragments de chair. Au matin on retire le poisson de l'eau et on l'expose au soleil toute la journée; le soir, vers 5 heures, on le pile avec du gros sel de façon à obtenir une pâte qui, placée ensuite dans des paniers durant la nuit, laissera exsuder une saumure. Le lendemain matin, la pâte est exposée en plein soleil et le soir elle est de nouveau pilée avec du sel jusqu'à salage convenable. Après ces deux pilonnages le produit est placé dans une jarre pendant deux ou trois jours; il en exsude encore une saumure qui se rassemble au fond du récipient, est séparée et, par la suite, vendue pour la consommation comme le Nuoc-mam.

La jarre est alors fermée avec un disque de bois s'appliquant exactement sur l'ouverture, ou un fragment d'étoffe fixé par une ficelle et enduit à l'extérieur d'un mortier fait de cendre imbibé d'eau.

Après deux ou trois mois, le Prâhoc de première qualité peut être consommé. Bien préparé il se conserve durant plus d'une année; la putréfaction ne commence guère à apparaître qu'au bout de deux ans et alors le produit doit être écarté de la consommation.

PRAHOC DE 2^e QUALITÉ. — On emploie pour ce Prâhoc exclusivement du petit poisson, le plus souvent les Trey Chang-wa, nom sous lequel on confond quelques variétés de petits poissons appartenant à la famille des Cyprinidés.

Pour la fabrication, le Cambodgien, sans prendre la peine de les vider, comprime entre ses mains plongées sous l'eau, et quelquefois avec ses pieds, les petits poissons entrant dans la préparation. Il en sépare ainsi les écailles et en exprime le contenu intestinal. Il lave ensuite à grande eau ces poissons écrasés et les abandonne une nuit entière dans l'eau avant de commencer le salage.

Le poisson salé et pilé est mis en jarre pour *maturation*. Ce Prâhoc est moins estimé que le précédent, mais sa préparation est bien plus rapide; un mois de séjour dans la jarre suffit. Il est dès lors prêt pour la consommation.

L'indigène des classes pauvres emploie ce Prâhoc pour relever les sauces de ses divers mets ou simplement le mélange au riz.

ANALYSE DE PRAHOC

CARACTÈRES ORGANOLEPTIQUES.

Aspect Pâte grossière.
Couleur. Jaune foncé.
Odeur. *Sui generis*.

ANALYSE CHIMIQUE.

	PRAHOC TOTAL pour 1.000	PARTIE SOLUBLE pour 1.000	PARTIE INSOLUBLE (par différence) pour 1.000
Réaction	»	»	»
Humidité	529,4	»	»
Extrait sec	470,6	306	164,6
Extrait dessalé	300,6	»	»
Cendres.	193,8	174	19,8
Chlorures.	170	»	»
<i>Éléments azotés constitutifs.</i>			
Azote total	37,8	22,4	15,4
— organique	»	17,92	»
— titrable au formol.	»	11,76	»
— ammoniacal.	»	4,48	»
— aminé.	»	7,28	»
<i>Répartition de la matière azotée dans la partie soluble du Pràhoc.</i>			
Azote total.	100	Azote ammoniacal.	20
— organique.	80	— aminé.	32,5
— formol.	52,5		

EXAMEN MICROSCOPIQUE.

Quelques cocci.]

III. — PADEC

Le Padec laotien a beaucoup d'analogie avec le Pràhoc cambodgien ; il n'en diffère que par quelques détails de préparation.

Pour préparer du Padec on vide les poissons de leurs intestins ; la partie la plus osseuse de la tête est jetée, le restant est ensuite coupé en morceaux et, sans être lavés durant une nuit

comme pour le Prâhoc, les fragments obtenus sont entassés dans des paniers. On place à la partie supérieure des paniers de lourdes pierres qui compriment la masse et font suinter un

ANALYSE DE PADEC

CARACTÈRES ORGANOLEPTIQUES.

Aspect Pâte grossière.
Couleur. Jaune brun.
Odeur. *Sui generis*.

ANALYSE CHIMIQUE.

	PADEC TOTAL pour 1.000	PARTIE SOLUBLE pour 1.000	PARTIE INSOLUBLE (par différence) pour 1.000
Réaction	»	»	»
Humidité	578,20	»	»
Extrait sec	421,80	264	157,8
Extrait dessalé	»	»	»
Cendres.	170,60	138	32,6
Chlorures.	160,05	160,05	»
<i>Éléments azotés constitutifs.</i>			
Azote total	26,60	17,36	9,24
— organique	»	13,05	»
— titrable au formol.	»	8,96	»
— ammoniacal	»	4,31	»
— aminé.	»	4,65	»
<i>Répartition de la matière azotée dans la partie soluble du Padec.</i>			
Azote total	100	Azote ammoniacal.	24,82
— organique	75,18	— aminé.	26,79
— formol	51,61		

EXAMEN MICROSCOPIQUE.

Coccus et quelques gros bâtonnets.

liquide d'odeur forte. Ce liquide s'écoule goutte à goutte par la partie inférieure du panier. On abandonne les fragments de poissons pendant trois jours à la pression des pierres dans les paniers suspendus. On pile ensuite la masse avec du sel jusqu'à

obtention d'une pâte qui est placée dans des sacs de feuilles de latanier. Après un séjour de deux ou trois jours dans ces sacs également suspendus et au travers desquels s'écoule la saumure, la masse est une deuxième fois pilée avec du sel et avec une certaine proportion de balle de paddy, puis mise en jarre où l'auto-digestion s'opère. Le Laotien consomme le Padec comme le Cambodgien consomme le Pràhoc pour relever le goût du riz ou des sauces; parfois, lorsqu'il y est obligé il l'utilise comme aliment principal, mélangé au riz.

Le rapprochement des résultats analytiques ci-dessus des résultats précédemment exposés montre que le Padec, le Pràhoc et le Mam-tôm sont des produits de composition chimique très voisine.

En effet l'extrait sec est de 352,8 p. 1.000 pour le Mam-Tôm, de 470,60 pour le Pràhoc et de 421,80 pour le Padec; nous trouvons 22,8 p. 1.000 d'azote total pour le Mam-Tôm, 37,8 pour le Pràhoc et 26,6 pour le Padec; le taux des chlorures est de 180 p. 1.000 pour le Mam-Tôm, 170 pour le Pràhoc et 160 pour le Padec. Si de ces déterminations, qui nous indiquent la richesse des produits étudiés en matériaux utiles, nous passons aux déterminations qui fixent la répartition de la matière azotée totale sous ses différents états et indiquent la qualité des produits, nous obtenons les chiffres suivants :

	Mam-Tôm	Pràhoc	Padec
Azote total	100	100	100
— organique. . .	68,9	80	75,2
— formol. . . .	60,2	52,5	51,6
— ammoniacal. .	31,4	20	24,8
— aminé. . . .	29,4	32,5	26,8

On voit par ces chiffres que les proportions de la matière azotée sous les différents états que nous considérons se trouvent exprimées pour chacun de ces trois produits par des nombres assez voisins.

Le taux de l'ammoniaque est un peu plus élevé chez le Mam-Tôm, ainsi qu'il le serait d'ailleurs sur des échantillons de Pràhoc et de Padec moins bien préparés ou plus anciens.

D'autre part, le Nuoc-mam présente une semblable répartition de la matière azotée sous ces différents états.

Le Pràhoc, le Padec et le Mam-Tòm sont des condiments solides présentant comme le Nuoc-mam le caractère de matière azotée désintégrée dont la teneur en azote égale et parfois dépasse celle des meilleurs Nuoc-mam.

Comme le Nuoc-mam, ce sont des produits de l'auto-digestion de la chair de poisson ou de crevettes par les ferments cellulaires, auto-digestion plus ou moins bien protégée de la putréfaction microbienne en raison de la présence du sel.

L'un de nous a montré dans une étude sur le Nuoc-mam ce rôle protecteur du sel : dès que le taux de salage s'abaisse au-dessous d'une certaine valeur, l'action microbienne prime l'action fermentaire; les acides aminés sont détruits et transformés en ammoniacque, il y a putréfaction et non digestion.

Comme le Nuoc-mam, le Mam-Tòm, le Pràhoc et le Padec renferment d'importantes quantités d'acides aminés qui expliquent leur valeur nutritive et justifient leur emploi dans l'alimentation.

Dans le Mam-Tòm, le Pràhoc et le Padec, on peut distinguer une partie soluble dans l'eau et une partie insoluble. La partie soluble dans l'eau est constituée par la chair de poisson ou de crevette solubilisée et par des sels minéraux dont le sel marin forme la presque totalité. Cette partie soluble, dissoute dans l'eau, constitue un véritable Nuoc-mam.

Le résidu insoluble est formé de chair de poisson non transformée et de sels terreux.

On trouve dans ces trois condiments :

Eau	52 à 65 p. 100
Partie soluble . . .	26 à 30 —
Résidu insoluble . .	8 à 17 —

En raison de leur composition chimique que nous venons d'établir, le Mam-Tòm, le Pràhoc et le Padec sont, comme le Nuoc-mam, des compléments indispensables de la ration alimentaire — faible en matière azotée — des peuples mangeurs de riz.

Ces préparations peu engageantes pour l'Européen — en raison de leur fumet quelque peu accentué — ne sont point du tout méprisables: leur valeur est réelle et sera d'autant plus grande que la préparation en aura été soignée, la matière pre-

mière employée plus fraîche, qu'une quantité suffisante de sel aura été utilisée.

On ne saurait trop l'affirmer, comme il y a du bon Nuoc-mam, il y a du bon Mam-Tôm, du bon Prâhoc et du bon Padec, que l'Européen, avec un peu d'habitude, peut apprécier; mais aussi il y a les qualités mauvaises qui comprennent les produits putréfiés dont l'odeur est véritablement repoussante. Ce sont ces produits putréfiés qui ont fait à tous ces condiments, supérieurs à nos sauces anglaises ou autres analogues, leur mauvaise réputation. Ce qu'il faudrait, ce serait pousser à l'amélioration de ces produits toutes les fois que cela sera possible, par le conseil d'une bonne fabrication. L'hygiène alimentaire de nos protégés indochinois, annamites, cambodgiens ou laotiens aura fait un progrès sérieux, lorsque, de tous les condiments qu'ils utilisent si abondamment et universellement, il ne pourra circuler et s'étaler sur les marchés que ceux bien préparés et conservés, possédant les qualités substantielles du produit vrai, non putréfié.

Saïgon, le 25 août 1918.

ÉTUDE COMPARÉE

DE DIVERSES SAUCES ALIMENTAIRES

par E. ROSÉ

Docteur ès sciences, chef de Laboratoire à l'Institut Pasteur de Saïgon,
 Directeur du Laboratoire officiel
 pour la répression des fraudes en Cochinchine.

Nous avons montré dans l'étude qui précède, que le Nuoc-mam se réduisait essentiellement à une solution salée de matières albuminoïdes assez fortement désintégrées. Nous avons établi le mode et le degré de cette désintégration.

L'analyse chimique nous a montré qu'un Nuoc-mam de très bonne qualité pouvait avoir la composition suivante :

		par litre
1°	{ Extrait brut	427 gr.
	{ Sel.	268 gr. 5
	{ Extrait dessalé	158 gr. 5
2° Matières azotées.	{ Azote total	22 gr. 400
	{ — titrable au formol . .	14 gr. 112
	{ — ammoniacal.	4 gr. 704
	{ — des acides aminés . .	9 gr. 408

Nous rappellerons, pour mémoire, que l'azote des acides aminés semble constituer le dernier terme des produits de désintégration utilisables par l'organisme animal, l'azote ammoniacal correspondant à un déchet ou à une matière minéralisée inutilisable par l'organisme humain ou animal. Un Nuoc-mam sera de qualité d'autant meilleure, de valeur alimentaire d'autant plus grande qu'il contiendra davantage d'acides aminés et moins d'ammoniaque.

Si nous exprimons les quantités des divers éléments azotés contenus dans un Nuoc-mam de très bonne qualité par les nombres obtenus en rapportant ces quantités à 100 parties

d'azote total, nous aurons pour ce même Nuoc-mam de très bonne qualité les nombres suivants :

Azote total.	100
— titrable au formol.	63
— ammoniacal.	21
— des acides aminés	42

On voit que, dans ce Nuoc-mam de très bonne qualité, l'azote des acides aminés est égal au double de l'azote ammoniacal.

On trouve dans le commerce local, sous le nom de sauces ou extraits, des produits d'utilisation mondiale et d'autres plus spécialement réservés à la clientèle sino-annamite vendus comme condiments ou accessoires culinaires. Il nous a paru intéressant de rechercher la composition chimique de ces produits et de la rapprocher, s'il y avait lieu, de celle du condiment national annamite qu'est le Nuoc-mam.

Voici les résultats analytiques obtenus :

a) *Produit européen.* — M, n° 1. Extrait dit pur, utilisable à la dose de quelques gouttes pour remonter les potages et autres mets :

		par litre
1°	Extrait brut	687 gr. 6
	Sel.	202 gr. 4
	Extrait dessalé.	485 gr. 2
2° Matières azotées.	Azote total.	62 gr. 720
	— titrable au formol. . .	35 gr. 600
	— ammoniacal.	9 gr. 072
	— aminé.	24 gr. 528

Calculons la répartition des différentes matières azotées pour 100 d'azote total, nous aurons les résultats suivants pour l'extrait étudié :

Azote total	100
— titrable au formol	53,6
— ammoniacal.	14,5
— aminé.	39,1

Si nous rapprochons ces nombres de ceux obtenus pour un Nuoc-mam de bonne qualité, nous voyons que ces deux catégories de nombres sont du même ordre de grandeur; dans le

Nuoc-mam la proportion des matières azotées désintégrées (azote titrable au formol) est un peu plus élevée, l'élévation portant surtout sur les proportions d'azote ammoniacal.

Si nous comparons les quantités absolues d'azote total trouvées dans un litre de l'Extrait M, nous voyons que cet Extrait M est environ trois fois plus riche en matière azotées que le Nuoc-mam considéré.

D'autre part, sa teneur en sel est assez voisine de la teneur en sel du Nuoc-mam; on peut donc dire que, aux caractères organiques près, l'Extrait M est très semblable à un Nuoc-mam dessalé et concentré.

Peut-on dessaler et concentrer le Nuoc-mam? Oui, à n'en pas douter.

Afin de respecter le plus possible la composition initiale de ce produit nous nous sommes adressé au mode de concentration réalisé par une faible source de chaleur (70°) à laquelle venait s'ajouter l'action du vide.

Nous donnons ci-dessous, avec la composition de l'Extrait M, la composition du Nuoc-mam qui a subi la concentration et celle du produit de cette concentration : 4 litres de Nuoc-mam ordinaire nous ont donné 1 litre de produit concentré.

	NUOC-MAM		EXTRAIT M
	ordinaire	concentré	
Acidité.	»	8,4	13,4
Azote total	25,08	66,08	62,7
— formol	18,00	43,01	33,6
— ammoniacal.	5,3	12,32	9,07
— aminé.	12,7	30,69	24,53
Extrait brut	445,8	749,00	687,6
Sel.	251,8	231,7	202,4
Extrait dessalé	194,8	517,3	485,2

Répartition de la matière azotée.

	NUOC-MAM		EXTRAIT M
	ordinaire	concentré	
Azote total	100	100	100
— formol	69	65,1	53,6
— ammoniacal.	20	11,6	14,5
— aminé.	49	46,5	39,1

Si l'on compare le Nuoc-mam concentré au Nuoc-mam

ordinaire initial, on voit que la répartition de ses matières azotées change peu ; il y a une légère diminution des acides aminés et une diminution plus sensible de l'ammoniaque. Le liquide provenant de la distillation dans le vide renferme l'ammoniaque déficitaire. Le sel s'est déposé aux trois quarts entraînant avec lui une proportion importante de matières azotées : en effet, 4 litres de Nuoc-mam ordinaire représentent 100 gr. 32 d'azote total et nous n'en retrouvons plus que 66 gr. 08 dans le Nuoc-mam concentré. Il y a une perte d'un tiers de la matière azotée mise en œuvre ; une partie de cette matière azotée perdue pourrait naturellement être récupérée par un lessivage et une purification du sel résiduaire.

La comparaison du Nuoc-mam concentré avec l'Extrait M est intéressante : on voit que les quantités des différents éléments déterminés et les quantités de l'azote total en particulier sont très voisines dans les deux produits.

Ce qui diffère davantage, c'est la répartition de cet azote total entre les différentes matières azotées ; il y a à la fois dans le Nuoc-mam plus d'azote titrable au formol, d'azote ammoniacal et d'azote aminé. La matière azotée dans le Nuoc-mam est un peu plus désintégrée que dans l'Extrait M. Mais c'est là seulement une différence de plus et de moins ; on peut régler, par des doses de sel convenable, la transformation de la chair de poisson dans la fabrication du Nuoc-mam et rendre le produit de cette transformation identique au produit dénommé « Extrait M » qui nous occupe.

Ainsi nous avons obtenu dans une expérience un Nuoc-mam qui, pour 100 parties d'azote total, renfermait :

48,4	d'azote	titrable au formol,
9	—	ammoniacal,
39,4	—	aminé.

Ce Nuoc-mam aussi riche en acides aminés était moins riche en azote ammoniacal que l'Extrait M ; d'autres Nuoc-mam contenaient les mêmes proportions d'ammoniaque (13,6).

Chimiquement parlant, le Nuoc-mam concentré peut donc être considéré comme très semblable sinon identique à la sauce « Extrait M ». Il en diffère cependant par ses caractères organoleptiques, odeur et saveur, qui rappellent le poisson.

Est-il possible de désodoriser ce Nuoc-mam concentré? Cela semble possible, et des recherches pourraient être effectuées dans ce sens qui aboutiraient à un résultat positif si l'utilisation du Nuoc-mam comme succédané de la sauce Extrait M devait représenter une opération commerciale rémunératrice.

Dans ce cas, l'aire d'extension du Nuoc-mam se trouverait considérablement augmentée au grand bénéfice des provinces productrices.

Je donne ci-dessous la composition des produits de concentration du Nuoc-mam par différents procédés : chauffage à feu nu, au bain-marie, par distillation dans le vide et enfin par le

Composition chimique d'un Nuoc-mam et de ses produits de concentration.

	AZOTE					
	acidité	total	formol	ammoniacal	aminé	sel
Nuoc-mam initial. . .	»	22,4	14,11	4,7	9,41	268,5
Sauce obtenue à feu nu.	4,6	48,16	31,36	8,4	22,96	238,7
Sauce obtenue au bain-marie	4,6	51,52	33,15	9,18	23,97	241,2
Sauce obtenue par distillation dans le vide.	7,6	48,16	31,14	8,51	22,63	229,3
Sauce obtenue par dialyse et distillation dans le vide.	3,4	35,84	22,62	3,62	19,6	248,4

Répartition de la matière azotée.

	AZOTE			
	total	formol	ammoniacal	aminé
Nuoc-mam initial.	100	63	21	42
Sauce obtenue à feu nu	100	65,1	17,14	47,7
Sauce obtenue au bain-marie .	100	64,3	17,8	46,5
Sauce obtenue par distillation dans le vide	100	64,7	17,7	47
Sauce obtenue par dialyse et distillation dans le vide . . .	100	63,1	8,4	54,7

dernier procédé de la distillation dans le vide joint à la dialyse. Par addition de magnésie calcinée au Nuoc-mam à concentrer, on se débarrasse d'une certaine quantité d'ammoniaque.

On voit par les tableaux ci-dessus que les trois premiers produits de concentration du Nuoc-mam sont très voisins comme composition quantitative et répartition de la matière azotée. Ils diffèrent du Nuoc-mam initial par une diminution des proportions relatives d'ammoniaque due à l'évaporation et à l'action de la magnésie calcinée, et par suite par une proportion un peu plus élevée d'acides aminés.

Le Nuoc-mam, obtenu par distillation dans le vide et dialyse, se sépare un peu des autres et est remarquable par sa faible teneur relative en ammoniaque, 8,4 au lieu de 17 et 21.

Si l'on envisage les différents procédés opératoires employés pour l'obtention de ce même produit concentré, on voit que la sauce obtenue à feu nu risque de prendre un goût de brûlé; au bain-marie l'évaporation est lente, la dialyse occasionne des pertes considérables.

La distillation dans le vide paraît le procédé de choix; on pourrait la réaliser industriellement dans des appareils analogues à ceux utilisés pour la production du lait condensé. Peut-être, tout simplement, le procédé de l'évaporation par chauffage à la vapeur de vastes récipients serait-il suffisant. En tout cas, dans tous ces procédés l'emploi d'un agitateur à ailettes mû mécaniquement paraît indispensable.

b) On trouve dans le commerce et destinées à l'alimentation sino-annamite, mais chinoise plus particulièrement, des sauces dites Soyous provenant d'un haricot, le *Soya hispida*.

Ces sauces renferment les produits de la désintégration des matières albuminoïdes de ce haricot.

Voici la composition chimique d'un Soyoo estimé, Soyoo marque F :

Acidité à la phénolphtaléine .	6 gr. 8	par litre.
Azote total	28 gr.	—
— formol	14 gr. 78	—
— ammoniacal	3 gr. 92	—
— aminé	10 gr. 86	—
Extrait brut	482 gr.	—
Sel	253 gr. 9	—
Extrait dessalé	228 gr. 1	—

La répartition des matières azotées pour 100 d'azote total est ainsi exprimée :

Azote total	100
— formol.	52,8
— ammoniacal.	14
— aminé.	38,8

Les quantités de matières azotées et d'extrait brut et dessalé montrent que le Soyou se place, au point de vue des quantités absolues de substances, entre le Nuoc-mam ordinaire et la sauce Extrait M; les proportions relatives des différentes matières azotées, la dose du sel montrent que, dans le Soyou comme dans le Nuoc-mam et la sauce Extrait M, nous avons affaire à des produits dérivés tous trois des matières albuminoïdes selon un processus de désintégration identique.

Soyou, Nuoc-mam et sauce Extrait M sont, au point de vue de la composition chimique relative, les mêmes produits qui, caractères organoleptiques mis à part, sont interchangeables.

Les Soyou ou sauces chinoises vendues sans marque et destinées au commun peuple sont un peu plus complexes; il y rentre des mélasses et l'on y trouve des sucres réducteurs en très notable proportion.

Voici les résultats analytiques de quatre sauces de qualités différentes :

Composition des sauces communes destinées à l'alimentation sino-annamite.

	ACIDITÉ à la phthaléine	AZOTE				SUCRES réduc- teurs	CHLO- RURES	EXTRAIT	
		total	formol	ammo- niacal	aminé			brut	des- salé
Qualité extra									
0 § 22 le litre . .	2,3	9,8	4,93	1,23	3,7	82	270,3	437	166,7
Première qual.									
0 § 12 le litre . .	2,8	11,48	4,48	1,23	3,25	113,6	253,9	484	230,1
Deuxième qual.									
0 § 10 le litre . .	2,3	11,2	3,58	1,01	2,58	87,5	266,8	455	188,2
Troisième qual.									
0 § 06 le litre . .	1,1	8,96	2,46	0,9	1,57	22,7	204,9	289,4	84,5

La répartition de la matière azotée est la suivante :

	AZOTE			
	total	formol	ammoniacal	aminé
Qualité extra.	100	50,4	12,6	37,8
Première qualité.	100	39	10,7	28,3
Deuxième qualité.	100	32	9	23
Troisième qualité.	100	27,5	10	17,5

Tous ces résultats nous montrent que ces sauces paraissent être un mélange de Soyau ou autre matière albuminoïde dégradée avec des sucres réducteurs provenant de mélasses. L'addition de mélasse de prix inférieur au Soyau abaisse le prix de revient du mélange. Ces sauces constituent un condiment à vrai dire peu engageant pour un palais européen, mais elles n'en ont pas moins comme le Nuoc-mam et le Soyau une certaine valeur alimentaire.

Au contraire, d'autres sauces agréables au goût ne sont que des condiments sans valeur nutritive. C'est ainsi que deux sauces anglaises analysées au même point de vue que les sauces précédentes nous ont donné les résultats suivants :

		Numéro 1	Numéro 2
Acidité.	pour 1.000	10,3	12,6
Azote total	—	3,08	4,2
— formol	—	1,12	0,9
— ammoniacal. . .	—	0,67	0,7
— aminé.	—	0,45	0,2
Chlorures	—	3,51	14,04

On voit qu'il n'y a là rien de comparable au Nuoc-mam, à l'Extrait M et au Soyau.

CONCLUSIONS.

Les conclusions qui découlent de l'ensemble des résultats analytiques exposés dans ce mémoire sont les suivantes :

1° Le Nuoc-mam, la sauce Extrait M, le Soyau sont des produits de même nature, provenant tous trois de la désintégration à un même degré de matières albuminoïdes. Les matières albuminoïdes originelles diffèrent de même probablement que l'agent de désintégration, mais la désintégration finale est la

même dans les trois cas et essentiellement les produits sont les mêmes.

Il y a entre eux des différences de quantités de matières azotées auxquelles viennent s'ajouter des différences dans les caractères organoleptiques tels que le goût et l'odeur, mais les différentes matières azotées produites sont les mêmes et dans les mêmes proportions relativement aux quantités de matière azotée totale.

Nous avons vu qu'on peut passer du produit le moins riche (Nuoc-mam) au produit le plus riche (Extrait M) par la concentration du premier produit. Il resterait à faire disparaître par un traitement approprié les caractères organoleptiques tels que saveur et odeur qui décèlent la matière albuminoïde originelle.

Au point de vue économique, le Nuoc-mam, le Soyou et la sauce Extrait M constituent dans leur essence des sources de matières azotées assimilables moins coûteuses que la viande elle-même (chair d'animal ou de poisson) à laquelle on doit s'adresser pour l'alimentation. Ces produits pourraient remplacer économiquement non pas toute la viande d'une ration alimentaire, mais une importante quantité. Ils peuvent ainsi diminuer le prix de la vie, d'où l'intérêt qu'ils présentent.

Or il est très probable que le Nuoc-mam constitue la source de matière azotée assimilable la moins coûteuse parmi les trois sources considérées.

Dans ces conditions, le remplacement par le Nuoc-mam du Soyou et surtout de sauce Extrait M pourrait très probablement constituer une opération industrielle commerciale rémunératrice tout en restant avantageuse pour les consommateurs et les producteurs actuels du Nuoc-mam.

La question que je viens de traiter au point de vue laboratoire demande à être étudiée industriellement et je la sou mets aux intéressés.

2° Les sauces dites anglaises sont de simples condiments dépourvus de valeur alimentaire propre.

Saïgon, le 23 septembre 1916.

Le Gérant : G. MASSON.

Paris. — L. MARETHEUX, imprimeur, 1, rue Cassette.